

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Direkte Induktion von Apoptose oder Nekrose in B16-Melanomzellen und deren Einfluss auf das Immunsystem

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Christine Lohmann
geb. Wolkewitz**

aus Bad Oldesloe

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Robert Besch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Wilhelm Bornkamm

Prof. Dr. Heiko Hermeking

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

25.05.2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 Apoptose	3
1.1.1 Der rezeptorvermittelte apoptotische Signalweg	4
1.1.2 Der mitochondriale apoptotische Signalweg	5
1.1.3 Physiologische und pathologische Relevanz von Apoptose	7
1.2 Nekrose	8
1.2.1 Signalweg während der Nekrose	8
1.2.3 Physiologische und pathologische Relevanz von Nekrose	10
1.3 Immunsystem	11
1.3.1 Die angeborene Immunität	11
1.3.2 Die erworbene Immunität	12
1.3.3 Antigenpräsentation	13
1.3.3.1 Antigenpräsentierende Zellen	13
1.3.3.2 Prozessierung und Präsentation von Antigenen	14
1.3.3.3 Kreuzpräsentation	15
1.3.4 Einfluss von toten Zellen auf das Immunsystem	15
1.4 Tumورimmunologie	16
1.5 B16 Mausmelanom-Modell	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2. MATERIAL und METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Zell-/Mauslinien	19
2.1.2 Geräte	20
2.1.3 Chemikalien	21
2.1.4 Antikörper	23
2.1.4.1 Fluoreszenzmarkierte Antikörper	23
2.1.5 Laborbedarf	24
2.1.6 Puffer	25
2.1.7 Kits	26
2.1.8 Molekulargewichtsmarker	27
2.1.9 Computer-Software	28

2.2 Methoden	29
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1.1 Herstellung des Nekrose- und Apoptosekonstrukts	29
2.2.2 Zellbiologische Methoden	32
2.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl	32
2.2.2.2 Herstellung von B16TREx	32
2.2.2.3 Herstellung von B16TREx-Bim _S und B16TREx-FADD/DD	33
2.2.2.4 Herstellung von B16Bim _S -Ova und B16FADD/DD-Ova	33
2.2.2.5 Nachweis von Zelltod	35
2.2.2.6 Einsatz des RIP1-Inhibitors Nekrostatin-1	35
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.3.1 Proteinanalyse im Westernblot	36
2.2.4 Immunologische Methoden	38
2.2.4.1 Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDC)	38
2.2.4.2 Aufnahme von toten B16-Zellen durch D2SC1 bzw. BMDCs	38
2.2.4.3 Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf dendritischen Zellen	39
2.2.4.4 Proliferationsassay von T-Zellen	39
2.2.4.5 Tetramerfärbung von OT1-T-Zellen	41
2.2.4.6 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Blut und der Milz	41
2.2.4.7 Intrazelluläre Zytokinfärbung	42
2.2.4.8 Zytotoxizitätsassay	43
2.2.5 Methoden im Mausmodell	44
2.2.5.1 Injektion	44
2.2.5.2 Tumoranalyse	44
2.2.5 Elektronenmikroskopie	46
3. ERGEBNISSE	47
3.1 Charakterisierung von B16Bim_S und B16FADD/DD	47
3.1.1 Nachweis der Expression von Bim _S und FADD/DD in B16TREx-Zellen	48
3.1.2 Morphologische Veränderungen von apoptotischen und nekrotischen B16-Zellen	48
3.1.2.1 Bim _S -induzierte apoptotische B16-Zellen	48
3.1.2.2 FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen	52
3.1.3 Lebend-Tod-Diskriminierung von Zellen durch Aufnahme von PI und Nachweis von Kern-Fragmentierung durch Bindung von PI an DNA-Fragmente	57
3.1.4 Nachweis von Phosphatidylserin-Externalisierung und des Verlustes der Zellmembran-Integrität	58
3.1.5 Caspasenaktivität	60

3.1.6 Inhibierung des nekrotischen Zelltodes durch Necrostatin-1	61
3.2 Einfluss von apoptotischen und nekrotischen B16-Tumorzellen auf Immunzellen <i>in vitro</i>	62
3.2.1 Generierung von B16Bim _S -Ova- und B16FADD/DD-Ova-Zellen	62
3.2.2 Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen durch die dendritische Zelllinie D2SC1	64
3.2.3 Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen durch BMDCs	65
3.2.4 Reifung von dendritischen Zellen durch Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen	67
3.2.5 Kreuzpräsentation von Antigenen aus apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen für CD8 ⁺ T-Zellen durch BMDCs	68
3.2.6 Freisetzung von HMGB1 als immunstimulierendes Signal	70
3.3 Einfluss apoptotischer oder nekrotischer B16-Tumorzellen auf das Immunsystem im Mausmodell	72
3.3.1 Tumorwachstum von B16Bim _S - und von B16FADD/DD-Tumoren <i>in vivo</i>	73
3.3.1.1 B16Bim _S -Tumore	73
3.3.1.2 B16FADD/DD-Tumore	75
3.3.2 Vakzinierungsmodell	76
3.3.3 B16-Tumorwachstum in Mäusen mit Vakzinierung	77
3.3.3.1 B16Bim _S -Tumore mit Vakzinierung	77
3.3.3.2 B16FADD/DD-Tumore mit Vakzinierung	77
3.3.4 Histologische Analyse von B16Bim _S - und B16FADD/DD-Tumoren	78
3.3.5 Immunologische Analyse von Mäusen mit etabliertem B16-Tumor, in dem Apoptose <i>in vivo</i> induziert wurde	82
3.3.5.1 Analyse der CD8 ⁺ T-Zell-Antwort in Mäusen mit etabliertem B16Bim _S -Tumor	82
3.3.6 Immunologische Analyse von Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden	84
3.3.6.1 Analyse der CD8 ⁺ T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen <i>in vivo</i>	84
3.3.6.2 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest zur Analyse der zytotoxischen T-Zell-Antwort auf apoptotische bzw. nekrotische B16-Tumorzellen	87
4. DISKUSSION	90
4.1 Morphologische Veränderungen in apoptotischen Bim_S-induzierten und nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen	90

4.2 Biochemische Veränderungen in apoptotischen Bim_S-induzierten und nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen	92
4.3 Einfluss von toten B16-Melanomzellen auf Immunzellen <i>in vitro</i>.....	93
4.3.1 Einfluss von apoptotischen Bim _S -induzierten oder nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen auf Immunzellen <i>in vitro</i>	94
4.3.2 Proinflammatorische Signale wie HMGB1	96
4.4 Einfluss von toten B16-Melanomzellen auf das Immunsystem <i>in vivo</i>	97
4.4.1 Analyse des Tumorwachstums.....	98
4.4.2 Histologische Analyse von Tumorgewebe	99
4.4.3 Immunologische Analyse von Mäusen mit etabliertem B16-Tumor, in dem Apoptose <i>in vivo</i> induziert wurde.....	99
4.4.4 Immunologische Analyse von Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden	100
4.4.5 Analyse der zytotoxischen T-Zell Antwort in Mäusen, die mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden	102
4.4.6 Mögliche weiterführende Experimente.....	103
Abkürzungsverzeichnis	105
Literaturverzeichnis.....	109
Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.: Morphologische Veränderungen in apoptotischen Zellen	3
Abb.2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg.	7
Abb.3: Morphologische Veränderungen in nekrotischen Zellen.	8
Abb.4: Möglicher Signalweg während der Nekrose.	10
Abb.5: Nekrosekonstrukt.	47
Abb. 6: Detektion von Bim _S und FADD/DD im Western Blot.	48
Abb.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von B16Bim _S -Zellen.....	49
Abb.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von B16Bim _S -Zellen	50
Abb.9: Zellkernfragmentierung in Bim _S -induzierten B16-Zellen.....	51
Abb.10: Zelltodinduktion in Bim _S -induzierten B16-Zellen.	51
Abb.11: FACS-Analyse von B16Bim _S -Zellen	52
Abb.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von B16FADD/DD-Zellen.....	54
Abb.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von B16FADD/DD-Zellen	55
Abb.15: Veränderungen der Kernmorphologie in FADD/DD-induzierten B16-Zellen.....	56
Abb.16: Durchflusszytometrische Analyse von B16FADD/DD-Zellen	56
Abb.17: Zelltodinduktion in Bim _S - und FADD/DD-induzierten B16-Zellen.....	57
Abb.18: FACS-Analyse von apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen.....	58
Abb.19: Zelltodanalyse von Bim _S - bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen.	59
Abb.20: Caspasenaktivierung.....	60
Abb.21: Necrostatin-1	61
Abb.22: Expression von GFP-Ovalbumin	63
Abb.23: Nachweis der Expression von Ovalbumin im Westernblot.....	63
Abb.24: Aufnahme von Bim _S - bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen durch die Zelllinie D2SC1.....	65
Abb.25: Phagozytose von B16Bim _S - bzw. B16FADD/DD-induzierten B16-Zellen durch BMDCs.....	66
Abb.26: Oberflächenexpression der costimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 auf dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs).....	68
Abb.27: Kreuzpräsentation von B16-Tumorzell-assoziiertem Antigen Ovalbumin durch BMDCs <i>in vitro</i>	69
Abb.28: Ausschüttung von HMGB1 nach Zelltodinduktion durch Bim _S bzw. FADD/DD.....	71
Abb.29: Skizze des <i>in vivo</i> Mausmodells, in dem B16-Tumoren subkutan gesetzt wurden...72	
Abb.30: B16Bim _S -Tumorstadium nach gleichzeitiger Apoptose-Induktion	73
Abb.31: Tumorstadium von etablierten B16Bim _S -Tumoren nach Apoptose-Induktion.....	74
Abb.32: Tumorstadium von etablierten B16FADD/DD-Tumoren nach Nekrose-Induktion	75

Abb.33: Skizze des <i>in vivo</i> Mausmodells, in dem B16-Tumoren subkutan gesetzt wurden...	76
Abb.34: Tumorwachstum von B16Bim _S -Tumoren nach Apoptose-Induktion in vakzinierten Mäusen.	77
Abb.35: Tumorwachstum von B16FADD/DD-Tumoren nach Nekrose-Induktion in vakzinierten Mäusen.....	78
Abb.36 Histologische Analyse von Bim _S -induzierten B16-Tumoren nach H&E-Färbung.....	79
Abb.37: Histologische Analyse von B16FADD/DD-Tumoren nach H&E-Färbung.	80
Abb.37: Mikroskopische Aufnahme eines Bim _S -induzierten apoptotischen B16-Tumors (H&E)	80
Abb.38: Auszählung der Apoptosen in Bim _S - bzw. FADD/DD-induzierten Tumoren.....	81
Abb.39: Tetrameranalyse der SIINFEKL-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen im Blut oder in der Milz von vakzinierten Mäusen mit etabliertem B16Bim _S -Tumor.....	82
Abb.40: Intrazelluläre Interferon-γ-Färbung von Splenozyten aus Mäusen mit etabliertem B16Ova-Bim _S -Tumor nach Vakzinierung mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären.....	83
Abb.41: Skizze des <i>in vivo</i> Mausmodells, in dem mit toten B16Ova-Zellen immunisiert und anschließend mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurde.	84
Abb.42: Tetrameranalyse der CD8 ⁺ T-Zellen im Blut von Mäusen, die mit Bim _S -induzierten bzw. FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden.	85
Abb.43: Tetrameranalyse der CD8 ⁺ T-Zellen aus den Milzen von Mäusen, die mit Bim _S -induzierten bzw. FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden.....	86
Abb.45: Intrazelluläre Interferon-γ-Färbung von Splenozyten aus Mäusen, die mit Bim _S - bzw. FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden	87
Abb.46: Skizze des Mausmodells, in dem mit toten B16Ova-Zellen immunisiert, mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert und anschließend ein Zytotoxizitätstest durchgeführt wurde.	88
Abb.47: Prozentzahl der lebenden T-Zellen nach Zytotoxizitätstest.....	89

Zusammenfassung

Allgemein werden zwei Arten von Zelltod unterschieden. Die Apoptose stellt einen programmierten Zelltod dar, der durch Abschnürungen der Zelle in apoptotische Körperchen charakterisiert ist, welche durch benachbarte Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden. Apoptose wurde weitgehend als eine immunologisch unauffällige Art von Zelltod gesehen, die keine Entzündungsreaktion verursacht.

Lange Zeit stand die Nekrose für eine unkontrollierte, zufällige Form von Zelltod, die in der Lyse der Zelle endet. Dabei wird die Membranintegrität aufgelöst und die zellulären Kompartimente werden in den extrazellulären Raum freigesetzt. Normalerweise führt dies zu einer Entzündungsreaktion des Körpers.

Diese beiden Annahmen werden schon lange diskutiert, denn neuere Studien ergaben, dass auch apoptotische Zellen immunstimulierende Wirkungen gezeigt haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen auf das Immunsystem zu analysieren. Dabei ist es wichtig, klar definierte Stimuli zu haben, die die Signalwege direkt und ohne Nebeneffekte induzieren. Dafür wurden zwei Systeme entwickelt, in denen bestimmte Todesgene exprimiert wurden, die den Signalweg zur Apoptose oder zur Nekrose in B16-Melanomzellen auslösen können.

Zur Induktion der Apoptose wurde die kurze Form des BH3-only Proteins Bim (Bim_S) gewählt, das den mitochondrialen Apoptoseweg aktiviert. Die Expression von Bim_S führt zur Aktivierung von Bak und Bax, die die Mitochondrienmembran für Cytochrom c durchlässig machen und somit zusammen mit Apaf-1 und der Procaspase 9 die Bildung des Apoptosoms ermöglichen. Die mitochondriale Signalkaskade endet in der Aktivierung von Caspase 3 und die Zelle zeigt typische apoptotische Veränderungen in der Morphologie. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Expression von Bim_S in B16-Melanomzellen Apoptose ausgelöst werden. In Bim_S -induzierten B16-Zellen konnte aktive Caspase 3 und typische morphologische und biochemische Charakteristika der Apoptose nachgewiesen werden.

Der nekrotische Signalweg ist noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch steht fest, dass während der Nekrose das Adapterprotein FADD und die Kinase RIP1 aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Expression und der Dimerisierung der FADD-Todesdomäne (DD) in B16-Melanomzellen der nekrotische Zelltod induziert werden. Die FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Zellen zeigten eine RIP1-Abhängigkeit und konnten morphologisch und biochemisch der Nekrose zugewiesen werden.

Die beiden Zelltodarten in den B16-Melanomzellen unterscheiden sich nach Bim_S - oder FADD/DD-Induktion morphologisch und biochemisch voneinander.

Nun stellt sich die Frage, ob auch physiologisch und in der Immunantwort ein Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose festzustellen ist.

Experimente *in vitro* zeigten die effiziente Aufnahme sowohl von apoptotischen als auch von nekrotischen B16-Melanomzellen durch dendritische Zellen. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass durch Phagozytose sowohl von apoptotischen als auch von nekrotischen B16-Melanomzellen durch dendritische Zellen T-Zellen zur Proliferation veranlasst wurden.

Somit konnte *in vitro* die Aktivierung einer adaptiven Immunantwort sowohl durch apoptotische als auch durch nekrotische B16-Melanomzellen nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden beide Arten von Zelltod gleichermaßen von dendritischen Zellen phagozytiert und verursachten eine T-Zell-Proliferation.

Erste Experimente *in vivo* ergaben tendenziell eine andere Situation. Mäuse, die mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Melanomzellen immunisiert wurden, zeigten nur bei nekrotischen B16-Zellen eine Immunreaktion. Dies konnte anhand einer leichten Erhöhung von CD8⁺ T-Zellen sowohl im Blut als auch in der Milz von Mäusen, die mit nekrotischen B16-Melanomzellen immunisiert wurden, nachgewiesen werden. Ein leichter Anstieg der Interferon- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen konnte ebenfalls nur in Mäusen nachgewiesen werden, die mit nekrotischen B16-Melanomzellen immunisiert wurden. Die Analyse der zytotoxischen T-Zell-Antwort in Mäusen, die entweder mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden, konnte die immunstimulierende Reaktion von nekrotischen Tumorzellen bestätigen. In Mäusen, die mit nekrotischen B16-Melanomzellen immunisiert wurden, konnte ein höherer zytotoxischer Effekt gemessen werden als bei Mäusen, die mit apoptotischen B16-Zellen immunisiert wurden. Diese ersten Daten deuten darauf hin, dass nekrotische B16-Melanomzellen *in vivo* eine immunstimulierende Reaktion hervorzurufen scheinen. Eine Immunisierung mit apoptotischen B16-Melanomzellen in Mäusen zeigte eine eher tolerisierende oder suppressive Immunantwort.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht im *Journal of Immunology* (2009, 182: 4538–4546) unter dem Titel: *Induction of Tumor Cell Apoptosis or Necrosis by Conditional Expression of Cell Death Proteins: Analysis of Cell Death Pathways and In Vitro Immune Stimulatory Potential*.

1. EINLEITUNG

1.1 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Selbstmord einer Zelle. Der programmierte Zelltod hat hohe physiologische Relevanz und dient der Beseitigung beschädigter, überflüssiger oder potentiell gefährlicher Zellen. Während der Apoptose wird die Integrität der verschiedenen Gewebe gewährleistet. Äußere Faktoren wie UV-Strahlung, chemische Substanzen, Schwermetalle oder Infektionen mit Bakterien oder Viren, können Zellen zur Apoptose veranlassen. Zuerst definiert wurde der Begriff „programmierter Zelltod“ 1964 von Lochshin und Williams als nicht zufällige, sondern gesteuert ablaufende Sterbeprozesse bei der Entwicklung von Organismen. 1972 führten Kerr et al. den Begriff „Apoptose“ als eine spezielle Art des programmierten Zelltodes ein, die durch charakteristische morphologische Eigenschaften gekennzeichnet ist. Die Zelle setzt aktiv eine Signalkaskade in Gang, die zu physiologischen und morphologischen Veränderungen führt. Zunächst schrumpft die Zelle, wobei Proteine fragmentiert werden, Chromatin kondensiert und DNA degradiert wird. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei Caspasen, durch welche die Proteine gespalten werden, die die Kernmembran stützen. Dadurch wird die DNA freigelegt und durch Nukleasen zerkleinert. Außerdem werden Proteine des Zytoskeletts und Adhäsionsmoleküle degradiert, wodurch sich die Zelle aus dem Zellverband löst und sich abrundet. Negativ geladene Phospholipidmoleküle wandern von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran wandern, wodurch die Zelle markiert und für den schnellen Abbau durch Makrophagen oder benachbarte Zellen freigegeben wird (Savill und Fadok, 2000).

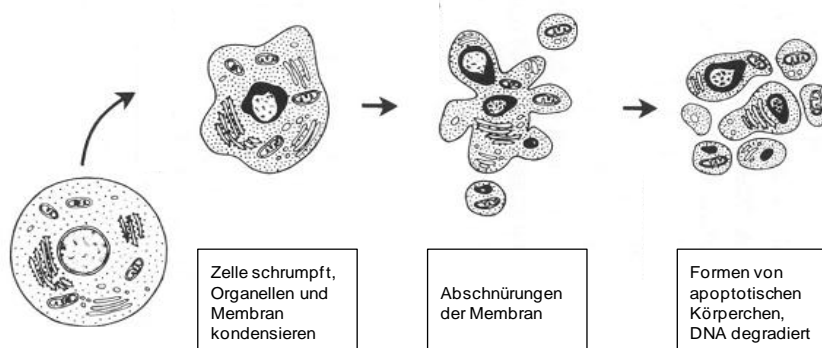


Abb.1.: Morphologische Veränderungen in apoptotischen Zellen. Zunächst schrumpft die Zelle und die Organellen und die Membran kondensieren. Anschließend schnüren sich die Membran und die Kompartimente ab und es formen sich apoptotische Körperchen.

Apoptose kann über einen extrinsischen (rezeptorvermittelten) und einen intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg ausgelöst werden. Beide Wege enden über eine Caspasenkaskade in der Aktivierung von Caspase 3. Diese verursachen die typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen von apoptotischen Zellen (Kumar 2007).

Caspasen (Cysteiny-Aspartasen) spielen eine wesentliche Rolle bei der Apoptose. Sie sind Cysteinproteasen, die Peptidbindungen am C-Terminus von Aspartat spalten können. Sie werden als inaktive Proenzyme synthetisiert, die durch Spaltung in ihre Untereinheiten aktiviert werden. In apoptotischen Zellen kann dies durch Autoproteolyse oder durch andere Proteasen geschehen. Caspasen werden in drei Gruppen unterteilt. Caspase-2, -8, -9 und -10 zählen zu den Initiatorcaspasen, die nach Autoaktivierung bei der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielen. Als zweite Gruppe gibt es Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die für die Prozessierung der meisten zellulären Proteine verantwortlich sind. Zur dritten Gruppe zählen Caspasen, die neben apoptotischen Funktionen auch an inflammatorischen Prozessen wie der Zytokinreifung beteiligt sind (Caspase-1 und -11) (Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.1.1 Der rezeptorvermittelte apoptotische Signalweg

Der extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie (zum Beispiel TNF-Rezeptor-1, Fas-Rezeptor) in der Zellmembran durch die Bindung von spezifischen Liganden wie zum Beispiel TNF α oder Fas-Ligand aktiviert. Todesrezeptoren besitzen ähnliche cystinreiche extrazelluläre Domänen und eine homologe zytoplasmatische Sequenz, die als Todesdomäne (*death domain* = DD) bezeichnet wird. Nach Bindung der jeweiligen Liganden folgt die Dimerisierung der intrazellulären Todesdomänen (DD) des heterotrimeren Rezeptors mit den entsprechenden Adapterproteinen TRADD (*TNF-R Associated Death Domain protein*) oder FADD (*Fas associated death Domain*). Die Todeseffektordomäne (DED) von FADD interagiert mit den Procaspasen 8 oder 10. Diese Komponenten bilden zusammen den DISC-Komplex (*Death Including Signalling Complex*), der die Procaspasen 8 und 10 aktiviert. Die aktivierten Caspasen 8 oder 10 verlassen den Komplex, um zytoplasmatische Effektorcaspasen wie Caspase 3 zu aktivieren (Strasser et al., 2000).

Der Fas-Rezeptor kann über Bindung des Fas-Liganden aktiviert werden und spielt nach Kawahara et al. (1998) beim Töten von virusinfizierten Zellen oder Krebs-Zellen durch zytotoxische T-Zellen bzw. Killer-Zellen eine wesentliche Rolle. Der Ligand des TNF-Rezeptors TNF α wird durch aktivierte Makrophagen und durch T-Zellen als Antwort auf eine Infektion produziert (Tartaglia und Goeddel, 1992). TNF α aktiviert Caspase 8, welche eine

Caspasen-Kaskade zur Apoptose initiiert bzw. den intrinsischen Weg über Bid aktiviert.

Die Initiierung der Apoptose über Todesrezeptoren ist für die Behandlung von Tumoren interessant, weil die Todesrezeptoren direkt die Caspasemaschinerie aktivieren. Diese Rezeptoren können dann unabhängig von dem Tumorsuppressorgen p53, welches in mehr als der Hälfte von humanen Krebszellen mutiert und somit inaktiviert ist, Tumorzellen in Apoptose leiten (Ashkenazi und Dixit, 1998).

1.1.2 Der mitochondriale apoptotische Signalweg

Der intrinsische Weg der Apoptose führt über die Mitochondrien und wird hauptsächlich durch Stressfaktoren im Inneren der Zelle ausgelöst. DNA-Schäden, Veränderungen im Oxidations- und Reduktionsstatus der Zelle, Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen aktivieren diesen Weg. Durch diese Faktoren kann es zur Ausschüttung von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien kommen, was den Verlust des Membranpotentials zur Folge hat (Green und Reed, 1998). Ein entscheidender Schritt bei der Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges ist die Freisetzung von Cytochrom c mit nachfolgender Aktivierung von Caspase-9.

Die Möglichkeit einer Zelle, das apoptotische Programm zu aktivieren, wird durch ein dynamisches Gleichgewicht aus Überlebensfaktoren und Todessignalen reguliert. Dabei spielen Bcl-2-Proteine eine wichtige Rolle, die die mitochondriale Apoptose regulieren (Joule und Strasser, 2008). Strukturell und funktional lassen sich drei Untergruppen der Bcl-2-Proteinfamilie unterscheiden. Zum einen gibt es die Bcl-2-*like* Proteine, die die Apoptose verhindern können. Dazu zählen die Proteine Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w und Mcl-1. Eine zweite Gruppe ist die der Effektoren, zu der die Proteine Bak und Bax zugeordnet werden. Diese Proteine sind die einzigen, die durch ihre Aktivierung die Ausschüttung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran veranlassen können. Die letzte Gruppe stellt die Initiatorproteine dar, die die Apoptose aktivieren können. Die Proteine dieser Gruppe enthalten nur die BH3-Domäne und werden BH3-*only* Proteine genannt. Zu dieser proapoptotischen Gruppe zählen Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Bmf, Hrk, Noxa und Puma. Sie können durch apoptotische Stimuli aktiviert werden.

In der Literatur werden zwei Modelle für die Aufgabe der BH3-*only* Proteine beschrieben. Nach dem direkten Aktivierungsmodell (Kuwana et al. 2005) können tBid und Bim direkt Bax im Zytosol binden und aktivieren. Bax integriert in die äußere Mitochondrienmembran und bildet ein Oligomer. Durch Bcl-2-*like* Proteine können tBid und Bim inaktiviert werden und somit kann die Bax-Aktivierung verhindert werden. Andere BH3-*only* Proteine wie Bad, Noxa

und Bid können wiederum über die Inhibierung der Bcl-2-*like* Proteine die Aktivierung von Bax veranlassen. Diese Proteine werden *sensitizer* genannt. Nach dem zweiten Modell, dem *Displacement*-Modell (Letai et al., 2002) werden alle Apoptose-Inhibitoren der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1) durch die direkte Bindung von BH3-*only* Proteinen wie Bim, Puma, Noxa und Bad blockiert. Bak ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und durch Mcl-1 oder Bcl-xL blockiert. Durch die Inhibierung dieser antiapoptotischen Proteine durch die BH3-only Proteine Bim, Puma, Noxa und Bad kann Bak aktiviert werden und Apoptose tritt ein.

Die aktivierten proapoptotischen Proteine Bak und Bax oligomerisieren in der äußeren Mitochondrienmembran und bilden Poren, durch die Cytochrom c ins Zytosol ausgeschüttet werden kann. Cytochrom c, ein Protein der Atmungskette, spielt in der mitochondrialen Apoptose eine wesentliche Rolle. Wenn es aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol entlassen wird, bindet es an das zytosolische Adapterprotein Apaf-1, das in Abhängigkeit von ATP/dATP das Apoptosom bildet, das die Procaspase-9 rekrutiert (Cory et al., 2002). Durch die Bildung des Apoptosoms wird die Caspase 9 aktiviert, ein Enzym, das durch die proteolytische Spaltung der Procaspase-3, Caspase-3 und -7 aktiviert (Peterson et al., 2010). Diese Signalkaskade führt zum apoptotischen Abbau der Zelle.

Beide Wege sind über das Protein Bid verbunden, das über die Initiatorcaspase 8 in seine aktive Form tBid umgewandelt wird und über die Mitochondrien Apoptose auslöst (Lutter et al., 2000).

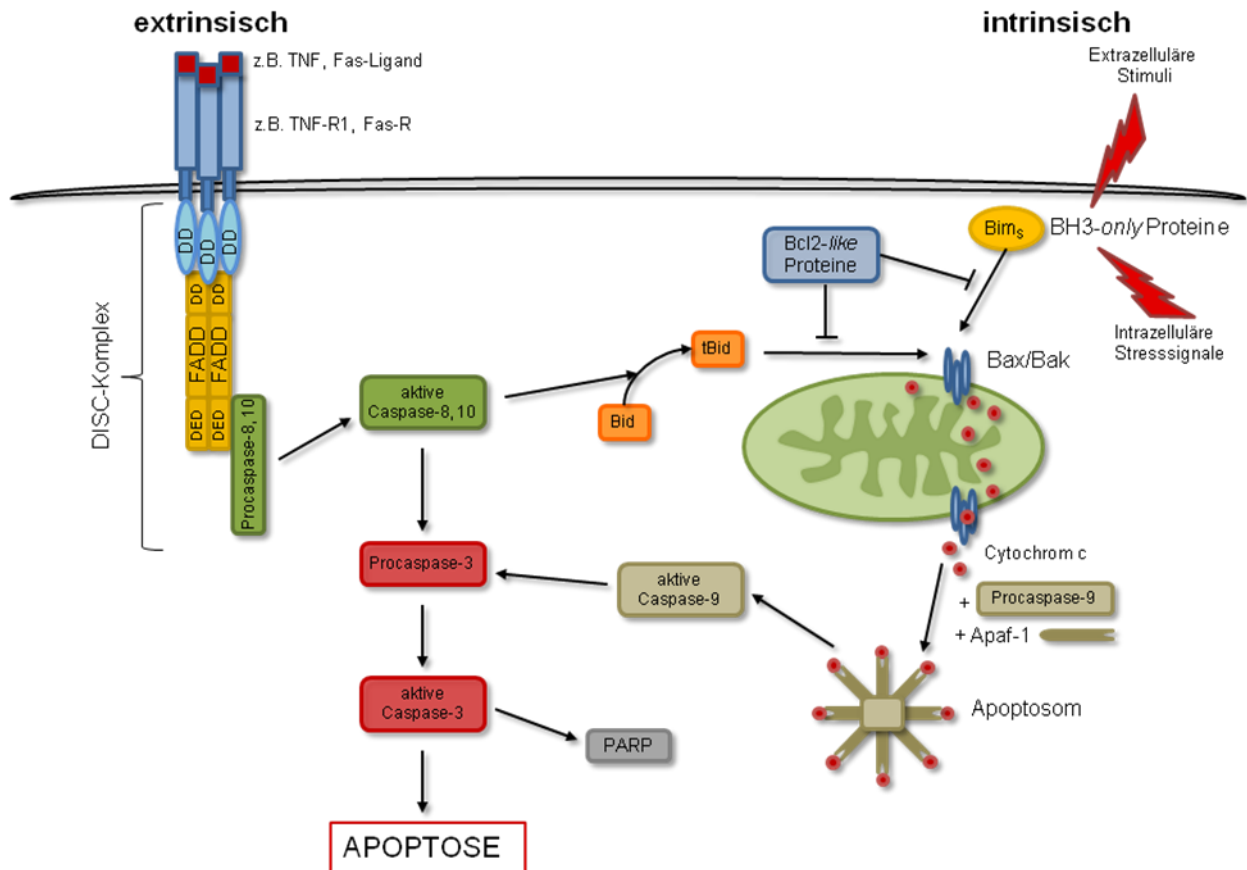


Abb.2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg. Apoptose kann über die Bindung von Liganden an den Oberflächenrezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie ausgelöst werden. Nach Rekrutierung von Caspase 8 und deren Bindung an das Adapterprotein FADD bildet sich der DISC-Komplex. Im intrinsischen Signalweg kann durch Stressfaktoren der mitochondriale Signalweg ausgelöst werden. Beide Wege resultieren in der Aktivierung von Caspase 3. Der mitochondriale Signalweg wird über Bcl-2-Proteine reguliert. Eine Aktivierung von Bak und Bax verursacht ein Ausschütten von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytochrom c bindet im Zytosol an Apaf-1 und die Procaspase 9 und bildet das Apoptosom. Durch die aktive Caspase 9 werden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert. Diese sind für die biochemischen und morphologischen Veränderungen von apoptotischen Zellen verantwortlich.

1.1.3 Physiologische und pathologische Relevanz von Apoptose

Apoptose spielt während der Embryogenese eine wesentliche Rolle. Durch den programmierten Zelltod bilden sich Organe und Gewebe heraus. Zum Beispiel wird während der Ausbildung der Finger und Zehen interdigitales Gewebe durch Apoptose reduziert. Auch bei der Formung der Linse, des Innenohrs und der Bildung des Herzgewebes und bei der Muskelentwicklung ist der programmierte Zelltod notwendig. Während der Entwicklung des Immunsystems findet eine Überproduktion von Immunzellen statt, die durch gezielten Selbstmord der Zellen im Gleichgewicht gehalten wird. Im ausgewachsenen Organismus dient Apoptose der Aufrechterhaltung der Homöostase, der Rückbildung der post-

lactationalen Milchdrüse und der Eliminierung von aktivierten Immunzellen nach einer Immunantwort.

Wenn der Apoptosemechanismus gestört ist, können verschiedene Krankheiten entstehen. Eine Fehlregulation des programmierten Zelltodes kann zu einer Wucherung von Zellen, zur Bildung von Krebs und auch zur Entwicklung von Autoimmunkrankheiten führen. Vermehrter Zelltod spielt bei Krankheiten wie Sepsis, Herzinfarkt, Diabetes, Schlaganfall und neurodegenerative Krankheiten eine wichtige Rolle.

1.2 Nekrose

Eine weitere Form von Zelltod stellt die Nekrose dar. Lange Zeit stand der nekrotische Zelltod für eine unkontrollierte, zufällige, nicht programmierte Form von Zelltod. Zellen, die zum Beispiel mit Gefrierschock oder mit Detergenzien behandelt wurden, starben einen unregulierten, wenig beschriebenen nekrotischen Zelltod (Krömer et al., 2009). Im Falle von Nekrose schwillt die Zelle mit ihren Organellen an (Oncosis), die Zellmembran wird durchlässig und die Membranintegrität ist aufgelöst. Die zellulären Kompartimente werden in den extrazellulären Raum freigesetzt und die Zelle lysiert.

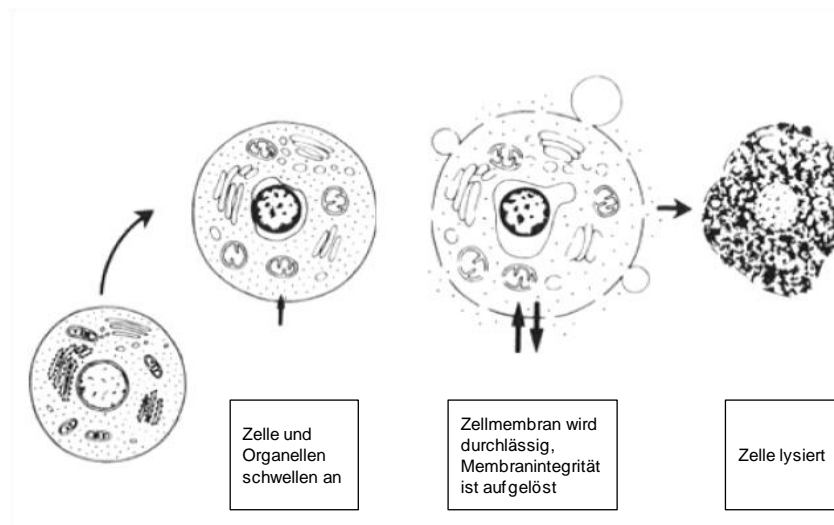


Abb.3: Morphologische Veränderungen in nekrotischen Zellen. Die Zelle schwillt samt Organellen an und die Membran wird durchlässig. Die Zellkompartimente werden in das umgebende Medium abgegeben.

1.2.1 Signalweg während der Nekrose

Die molekularen Mechanismen der Nekrose wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Viele Details sind noch ungeklärt. Man fand heraus, dass nekrotischer Zelltod

auch gezielt durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann, zum Beispiel über den Membranrezeptor TNFR1, TLR-4 oder über Bakterien und Viren. Wenn Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie über extrazelluläre Liganden aktiviert werden, hängt es vom zellulären Kontext ab, ob Apoptose oder Nekrose stattfindet. Auch andere Gruppen, wie Kawahara et al. (1998) und Holler et al. (2000) konnten zeigen, dass in Jurkat-Zellen durch die Aktivierung des TNF-R1, Fas oder TRAIL-R in Anwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk oder bei FADD- oder Caspase-8-Defizienz Nekrose stattfand. Yin et al. (2004) fanden heraus, dass auch in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) TNF α in Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren einen Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen kann. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Nekrosesignalweg als „*back-up*“-Signalweg anstelle von Apoptose verfügbar ist, wenn Caspasen blockiert sind und somit der apoptotische Signalweg verhindert ist.

Das FADD-Protein spielt bei der extrinsisch induzierten Apoptose eine wesentliche Rolle, kann aber auch zur Nekrose führen. Über seine am C-terminalen Ende lokalisierte Todesdomäne (DD) kann FADD an den Todesrezeptor gebunden werden. Die homologe Todeseffektordomäne (DED) von FADD interagiert mit der Prodomäne der Caspase-8 und kann so die Apoptosemaschinerie in Gang setzen. Lawrence et al. (2005) fanden heraus, dass in FADD-defizienten Jurkat-Zellen die TNFR1-induzierte Apoptose blockiert ist und die Zellen nekrotisch sterben. Wenn die FADD-defizienten Jurkat-Zellen über den Fas-Liganden induziert werden, findet weder Apoptose noch Nekrose statt. Dies deutet darauf hin, dass TNFR1-induzierte Nekrose unabhängig von FADD ablaufen kann, Fas-induzierte Nekrose hingegen nicht (Lawrence et al., 2005).

Vanden Berghe *et al.* haben 2004 die Todesdomänen von FADD separat untersucht und fanden heraus, dass die FADD-Todeseffektordomäne (DED) allein über die Rekrutierung von Caspase 8 den extrinsischen Apoptoseweg auslösen kann. Dies kann durch zVAD-fmk blockiert werden. Dahingegen bindet die FADD-Todesdomäne (DD) an die Kinase RIP1 und die Zelle stirbt nekrotisch.

Die RIP1-Kinase wurde als wichtiger Initiator der todesrezeptorvermittelten Nekrose entdeckt (Festjens et al., 2007). Degterev et al. (2008) identifizierten Necrostatin-1 als einen chemischen Inhibitor der Kinaseaktivität von RIP1. Somit kann der über RIP1 vermittelte nekrotische Zelltod durch Necrostatin-1 verhindert werden. Während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose blockiert Caspase-8 RIP1, was deren antiapoptotische bzw. pronekrotische Eigenschaft verhindert und Apoptose stattfinden lässt (Galluzzi et al., 2009).

Es ist noch weitgehend unklar, wie das Zusammenspiel der zellulären Prozesse, Organellen und Mediatoren im nekrotischen Zelltod organisiert ist. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass während der Nekrose reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Calcium, Calpaine, Cathepsine, Phospholipasen und Ceramide eine Rolle spielen (Vanlangenakker et al., 2008).

Oxidativer Stress kann DNA, Proteine und Lipide schädigen. Eine Calcium-Anhäufung in Mitochondrien kann Phospholipasen, Proteasen und die Stickstoffmonooxyd-Synthase (NOS) aktivieren, das den nekrotischen Prozess einleiten kann (Duprez et al., 2009).

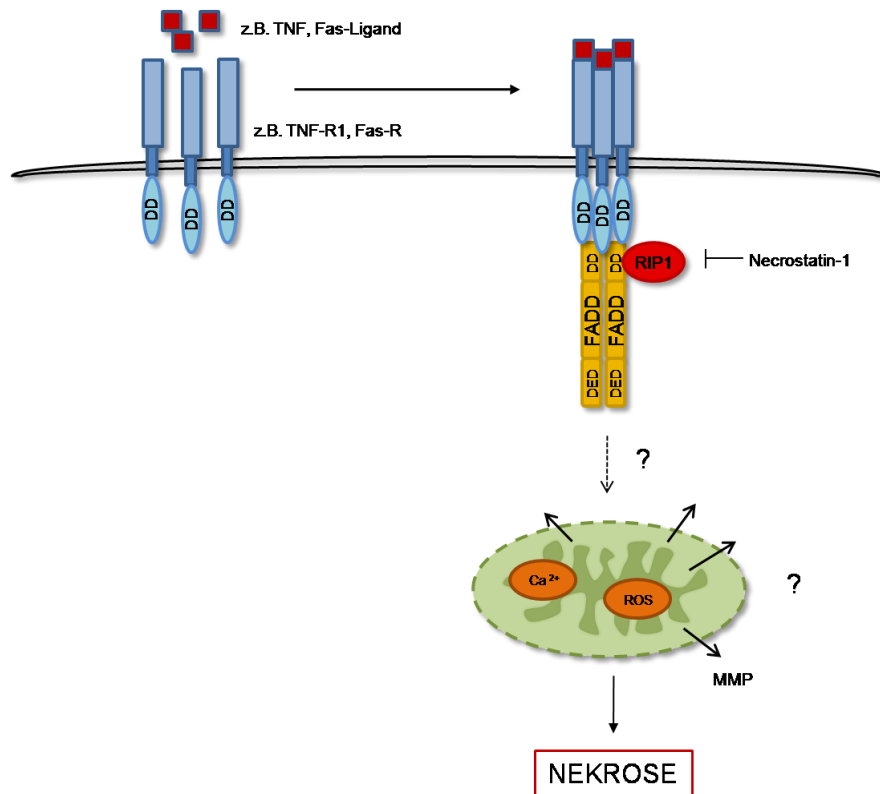


Abb.4: Möglicher Signalweg während der Nekrose. Das Adapterprotein FADD ist über die Todesdomänen (DD) an die intrazellulären Todesdomänen des Membranrezeptors gebunden. Durch Bindung von RIP1 an die Todesdomäne von FADD wird Nekrose ausgelöst. Während des Signalweges können die Mitochondrien eine Rolle spielen.

1.2.3 Physiologische und pathologische Relevanz von Nekrose

Nekrotischer Zelltod kann einen Alternativweg zur Apoptose darstellen, um Zellen zu eliminieren. Zum Beispiel haben Chautan *et al.* (1999) bei der Beseitigung von interdigitalen Zellen während der embryonalen Entwicklung von Mäusen nach Zugabe des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk oder bei Apaf-1^{-/-} Mäusen einen Caspase-unabhängigen nekrotischen Prozess beobachtet. Nekrose findet während der Entwicklung statt, zum Beispiel beim Absterben von Chondrocyten (Roach und Clarke, 1999), die das longitudinale Knochenwachstum kontrollieren, während der Ovulation oder in der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität, zum Beispiel in intestinalen Epithelienzellen (Festjens et al., 2006). Nekrotischer Zelltod spielt auch eine Rolle beim Absterben von T Lymphozyten (Holler et al., 2000). Duprez et al. (2009) betonen, dass nekrotischer Zelltod immer im Zusammenhang mit

Apoptose oder mit Caspase-Inhibitoren gesehen werden muss, vor allem in seiner Funktion eines „*back-up*“-Mechanismus anstelle von Apoptose.

Nekrose hat häufig pathologische Auswirkungen. Zum Beispiel kann es durch Ischämie mit nachfolgender Reperfusion zur Nekrose kommen und Organe schädigen (Neumar, 2000). Ankarcrona et al. haben bereits 1995 gezeigt, dass Nervenzellen durch eine Überaktivierung der Glutamat-Rezeptoren nekrotisch sterben. Dies kann zu einem Schlaganfall, traumatischen Gehirnschäden und neurodegenerativen Fehlsteuerungen führen. Degterev et al. (2005) haben im Falle der RIP1-abhängigen Nekrose ischämische Hirnschäden und Herzinfarkt in Mäusen beobachten können. Diese Schäden konnten durch den Einsatz des RIP1-Inhibitors Necrostatin-1 verhindert werden.

1.3 Immunsystem

1.3.1 Die angeborene Immunität

Das Immunsystem ist ein komplexer Abwehrmechanismus des Körpers, der aus einer angeborenen und einer erworbenen Immunreaktion besteht. Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und stellen eine erste Verteidigungslinie gegen Eindringlinge wie Bakterien oder Viren dar. Sie reagieren auf eine Infektion, indem sie Pathogene phagozytieren, das Komplementsystem aktivieren oder Cytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide sekretieren. Pathogene werden aufgrund von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) wie zum Beispiel Lipopolysacchariden (LPS), Flagellin, Peptidoglycanen, CpG-DNA oder doppelsträngiger RNA durch sogenannte mustererkennende Rezeptoren (PRRs = pattern recognition receptors) wie zum Beispiel Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) erkannt. Diese Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen und können zum Beispiel den Transkriptionsfaktor NF- κ B stimulieren, der wiederum Gene der Infektionsabwehr aktiviert. Durch Aktivierung der TLRs kann es zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und zur Expression von MHC- und costimulatorischen Molekülen kommen. Zusätzlich können TLRs verschiedene Effektormoleküle wie zum Beispiel antimikrobielle Peptide oder eine Stickstoffoxid-Synthase induzieren, die mikrobielle Pathogene direkt zerstören können (Thoma-Uszynski, 2001). Zudem erkennt das Immunsystem auch sogenannte *damage*-assoziierte molekulare Muster (DAMPs = *damage associated molecular patterns*), die endogene Warnsignale der Zelle darstellen. Diese werden vor allem während des nekrotischen Zelltodes freigesetzt und lösen

eine Entzündungsreaktion aus. Das DNA-bindende Molekül *high mobility group box 1* (HMGB1) stellt ein solches Warnsignal dar und scheint einen wichtigen Einfluss auf die Reaktion des Immunsystems zu haben (Tang et al. 2010). Weitere DAMPs stellen nach Sims et al. (2010) beschädigte Produkte der extrazellulären Matrix dar, wie zum Beispiel Fragmente der Hyaluronsäure, Hitzeschockproteine (HSPs), Proteine der S100 Familie, Amyloid- β -Fibrillen, Harnsäure-Kristalle, Zytokine wie IL-1 α und IL-33 und kernassoziierte Proteine wie HMGB1. Dennoch ist über DAMPs noch wenig bekannt. Einige Arbeiten (Halle et al., 2008; Gasse et al. 2009) deuten darauf hin, dass das NALP3 Inflammasom bei der Reaktion des Immunsystems auf DAMPs eine wesentliche Rolle spielt (Sims et al., 2010). Werden PAMPs oder DAMPs von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) erkannt, können dendritische Zellen zur Reifung aktiviert werden. Sie verlassen das periphere Gewebe, wandern in die Lymphknoten und präsentieren dort Antigene für T- und B-Lymphozyten. Die erworbene Immunantwort wird in Gang gesetzt.

1.3.2 Die erworbene Immunität

Antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen stellen eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar. B- und T-Lymphozyten sind Zellen der erworbenen Immunität und treten erst ab dem dritten oder vierten Tag nach einer Infektion auf. Sie haben einen flexibleren Abwehrmechanismus entwickelt und bieten gegen eine erneute Infektion mit demselben Erreger einen erhöhten Schutz (Janeway und Medzhitov, 2002). Extrazelluläre Bakterien und ihre toxischen Abbauprodukte können von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen aufgenommen werden. Aufgenommene Antigene von Pathogenen oder Tumoren können durch antigenspezifische Rezeptoren der B- und T-Zellen erkannt werden.

T-Zellen spielen während der erworbenen Immunität eine wesentliche Rolle und werden in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden. Nach der Erkennung von Antigenen differenzieren naive CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische T-Zellen und lysieren die infizierte Zelle. CD4⁺ T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, sind darauf spezialisiert, andere Zellen zu aktivieren und werden in zwei Untergruppen (T_H1- und T_H2-Zellen) eingeteilt, die sich in ihrem Zytokinsekretionsmuster unterscheiden. T_H1-Zellen, die zum Beispiel Zytokine wie IFN γ , TNF α , IL-2 sekretieren, sind für die zellvermittelte Immunität zuständig. Sie aktivieren Makrophagen, die die intravesikulären Erreger in ihrem Inneren abtöten. T_H2-Zellen fördern die humorale Immunantwort. Sie veranlassen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern.

Auf welche Weise dendritische Zellen oder Makrophagen das aufgenommene Antigen präsentieren und somit eine erworbene Immunreaktion auslösen, wird im folgenden Abschnitt erklärt.

1.3.3 Antigenpräsentation

Das Immunsystem ist in der Lage, Selbst von Fremd zu unterscheiden. Für die Erkennung von Fremdmolekülen im Körper dienen Antigen-Rezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten. Normalerweise entwickeln Lymphozyten eine Selbst-Toleranz gegenüber den körpereigenen Molekülen. Entstehen während der Reifung im Thymus bzw. Knochenmark B- oder T-Zellen mit Rezeptoren, die körpereigene Moleküle erkennen, werden diese umgehend getötet oder in einen funktionslosen Zustand überführt. Somit bleiben nur Lymphozyten übrig, die gegen fremde Moleküle reagieren.

Das angeborene Immunsystem stellt eine Gruppe von Proteinmolekülen zur Verfügung, die man Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) nennt. Zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen markieren Zellen als körpereigen. MHC-Klasse-I-Moleküle findet man auf kernhaltigen Zellen und somit auf fast jeder Körperzelle. MHC-Klasse-II-Moleküle beschränken sich hingegen auf Makrophagen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen. Durch die Art (Peptid oder Lipid) und die Herkunft (extra- oder intrazellulär) eines Fremdantigens wird die Präsentation und deren Auswirkung bestimmt. (Janeway und Medzhitov, 2002)

1.3.3.1 Antigenpräsentierende Zellen

Körperfremde Moleküle und Antigene können von sogenannten antigenpräsentierenden Zellen erkannt werden. Zellen mit dieser Fähigkeit sind dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen, wobei DCs am höchsten spezialisiert sind. Antigenpräsentierende Zellen können Antigene aufnehmen und bilden einen Komplex aus Antigenfragment und MHC-Molekül, das sie auf ihrer Oberfläche präsentieren. T-Zellrezeptoren können an diesen Komplex binden, naive T-Zellen aktivieren und diese zur Proliferation und Differenzierung veranlassen. Antigenpräsentierende Zellen senden zusätzlich costimulierende Signale wie die Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die T-Zellen zum Wachstum anregen, indem sie das T-Zell-Rezeptorsignal verstärken. Auch das Oberflächenmolekül CD40, das sich auf den antigenpräsentierenden Zellen befindet, kann Aktivierungssignale an T-Zellen vermitteln, wenn diese über den CD40-Liganden an das Oberflächenmolekül auf den Antigenpräsentierende Zellen binden. Interleukin-12 kann natürliche Killer-Zellen aktivieren und die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T_H1 -Zellen induzieren.

Um Antigene effektiv präsentieren zu können, müssen dendritische Zellen aus einem unreifen Zustand, in dem sie nur wenige MHC-Proteine und keine costimulatorischen Moleküle besitzen, in einen reifen Zustand wechseln. Im unreifen Zustand können sie

Antigene aufnehmen, wandern dann aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten, wo sie neue MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle synthetisieren, mit denen sie die Peptide von Proteinen präsentieren können. Im reifen Zustand verringert sich die Fähigkeit von DCs, andere Zellen aufzunehmen und es kommt zu einer erhöhten Expression von MHC- und costimulatorischen Molekülen, wie den Adhäsionsmolekülen DC-SIGN und B7-Molekülen und von Zytokinen (zum Beispiel Interleukin-12).

Makrophagen nehmen ständig tote Zellen auf, die zahlreiche Autoantigene enthalten. Daher ist es besonders wichtig, dass nur dann T-Zellen aktiviert werden, wenn tatsächlich eine mikrobielle Infektion oder entartetes Gewebe vorliegt. Erst durch den Kontakt mit Mikroorganismen werden ruhende Makrophagen dazu veranlasst, MHC-Klasse-II- und B7-Moleküle auf der Oberfläche zu exprimieren und fremde Molekülmuster zu erkennen.

Unreife DCs sind zwar in der Lage, lösliche Antigene aus der extrazellulären Matrix durch Makropinozytose aufzunehmen, doch B-Zellen können spezifisch lösliche Moleküle binden. B-Zellen binden die Antigene an Immunglobulinrezeptoren auf ihrer Oberfläche und können spezifische Antigenfragmente präsentieren. Außerdem können sie zur Produktion von costimulatorischen Signalen (B7.1 und B7.2) angeregt werden und somit naive T-Zellen aktivieren. B7.1 wurde zuerst auf B-Zellen gefunden, die durch mikrobielle Lipopolisaccharide aktiviert waren. In vielen Immunisierungs-Experimenten wird zusätzlich ein bakterielles Adjuvans injiziert, um eine Immunreaktion auf lösliche Proteine wie zum Beispiel Ovalbumin hervorzurufen, da möglicherweise B-Zellen als Antigenpräsentierende Zellen benötigt werden.

Das Zusammenspiel von Antigenaufnahme und costimulatorischen Signalen ist sehr sensibel, damit keine Immunreaktion auf körpereigene Antigene hervorgerufen wird. (Janeway und Medzhitov, 2002)

1.3.3.2 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Antigenpräsentierende Zellen nehmen Antigene auf und bauen sie zu Peptiden ab. Anschließend werden sie an spezialisierte Glykoproteine der Wirtszelle, den sogenannten MHC-Molekülen, gebunden und an der Oberfläche für T- oder B-Zellen präsentiert.

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren vor allem intrazelluläre Antigene. Körpereigene oder -fremde zytosolische Proteine werden im Proteasom der antigenpräsentierenden Zelle in kleine Peptide zerkleinert, die über den Transporter TAP (*transporter associated with Antigen processing*) an das endoplasmatische Retikulum befördert werden. Dort binden die Peptidfragmente an das MHC-Klasse-I-Molekül, werden auf der Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zelle präsentiert und können so von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Diese CD8⁺ T-Zellen sind nun in der Lage, MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von

Zellen zu erkennen, die dieses Fremdartigen präsentieren und Zelltod auslösen. Sie werden zytotoxische CD8⁺ T-Zellen genannt.

MHC-Klasse-II-Moleküle können extrazelluläre Antigene präsentieren, die von professionellen Phagozyten wie Makrophagen und dendritische Zellen aufgenommen wurden. Exogene Antigene werden in Vesikeln der phagozytierenden Zelle aufgenommen, im Phagolysosom in kleine Peptidfragmente zerlegt und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden. Der Komplex aus MHC-Klasse-II-Molekül und Antigenfragment kann nun an der Zelloberfläche für CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. CD4⁺ T-Zellen können entweder eine zellvermittelte oder eine humorale Immunantwort auslösen. (Savina und Amigorena, 2010).

1.3.3.3 Kreuzpräsentation

Eine weitere Eigenschaft antigenpräsentierender Zellen ist die Kreuzpräsentation. Wie in Abschnitt 1.3.1.2 beschrieben nehmen dendritische Zellen exogene Antigene in ihren Endosomen und/oder Phagosomen auf und können diese für eine MHC-Klasse-II-Präsentation für CD4⁺ T-Zellen prozessieren. Dendritische Zellen sind aber auch in der Lage, exogene Antigene in das Zytosol zu verlagern und sie so dem MHC-Klasse-I Prozessierungssignalweg zur Kreuzpräsentation für CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung zu stellen. Somit können zum Beispiel exogene tumorassoziierte Antigene, die von dendritischen Zellen aufgenommen wurden, über den Weg der Kreuzpräsentation eine zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort auslösen (Amigorena und Savina, 2010).

1.3.4 Einfluss von toten Zellen auf das Immunsystem

In der Literatur wird der Einfluss von Zelltod auf das Immunsystem kontrovers diskutiert. Apoptose wird generell als eine immunologisch unauffällige Art von Zelltod gedeutet, da die Integrität der Plasmamembran lange anhält und die sterbende Zelle sehr schnell phagozytiert wird ohne proinflammatorische Signale zu senden. Diese Annahme wird unterstützt durch Studien, in denen Makrophagen nach Aufnahme von apoptotischen Zellen antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGFβ ausschütten (Savill et al., 2002 und Fadok et al., 1998). Wenn eine Zelle hingegen nekrotisch stirbt, verliert sie sehr schnell ihre Membranintegrität, was das Ausschütten von proinflammatorischen Signalen erklären würde (Savill et al., 2002). Andererseits haben Albert et al. (1998) gezeigt, dass Infektionen mit Influenza-Virus oder Salmonella-Bakterien Apoptose in infizierten Makrophagen induzieren können, was nach Aufnahme von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen eine Stimulation von T-Zellen zur Folge hatte. Ebenso konnten Janssen et. al. 2006 durch

Injektion von apoptotischen Zellen in Mäuse proinflammatorische Signale wie die Produktion von Typ I IFN durch DC nachweisen. Andere Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen, die durch Anthracycline (Casares et al., 2005) oder ionisierte Bestrahlung (Obeid et al., 2007) in Apoptose geführt wurden, eine starke Immunantwort *in vivo* auslösen. Dies wirft Zweifel an der antiinflammatorischen Wirkung von apoptotischen Zellen auf.

Im Gegensatz zur Apoptose ist über die biochemischen Veränderungen in nekrotischen Zellen noch wenig bekannt. Nekrose wird immunologisch stimulierend angesehen, da proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel Interleukin-8, -10 oder der Tumornekrosefaktor- α ausgeschüttet oder proinflammatorische Mediatoren wie HMGB1 (*high-mobility group box 1*) freigesetzt werden. Es wird diskutiert, ob HMGB1 nur von nekrotisch sterbenden Zellen oder auch von apoptotischen Zellen ausgeschüttet wird. Scaffidi et al. (2002) postulieren, dass HMGB1, das von nekrotischen embryonalen Maus-Fibroblasten freigesetzt wird, durch seine Zytokinaktivität Monocyten zur Produktion des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) anregen. Bell et al. (2006) und Jiang et al. (2007) konnten zeigen, dass auch während der Apoptose HMGB1 ausgeschüttet wird.

Die Aufnahme von nekrotischen Tumorzellen kann nach Sauter et al. (2000) und Kacani et al. (2005) eine Reifung von DCs *in vitro* verursachen, Makrophagen zur Antigen-Präsentation veranlassen (Barker et al., 2002) und Endothelzellen aktivieren. Im Gegensatz dazu verursachen apoptotische Tumorzellen nach Chen et al. (2006) solche Prozesse nicht.

1.4 Tumorummunologie

Obwohl bekannt ist, dass Bestandteile von Mikroorganismen und Viren (PAMPs) wie zum Beispiel LPS oder doppelsträngige RNA eine Reifung von dendritischen Zellen induzieren können, ist es nicht klar, welchen Einfluss sterbende Tumorzellen auf die DC-Reifung nehmen (Medzhitov, 2001). Optimal wäre die Induktion einer Immunantwort gegen Tumorzellen, wenn zwischen den körpereigenen wuchernden Tumorzellen und dem normalen Gewebe unterschieden werden könnte.

Einige Untersuchungen zeigen, dass sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) durch MHC-Moleküle der Tumorzelle für T-Zellen präsentiert werden können (Ochsenbein et al. 2001). Diese Peptide können eine tumorspezifische T-Zell-Reaktion hervorrufen. Allerdings reichen sie oft nicht aus, um naive T-Zellen zu aktivieren. Dies liegt daran, dass weitere stimulatorische Signale fehlen (Willimsky et al. 2005). Das Phänomen der Selbst-Toleranz wird hier zum Problem, da das Immunsystem wirtseigene Tumorantigene toleriert. Durch klonale Deletion oder Inaktivierung von heranreifenden Lymphozyten wird die Selbst-

Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe erreicht. Um Tumorantigene dem Immunsystem als „fremd“ zu markieren und besser verfügbar zu machen, müsste sterbendes Tumorgewebe phagozytiert werden. Dendritische Zellen können Tumorzellen, die durch NK-Zellen getötet wurden, aufnehmen und die tumorassoziierten Antigene für zytotoxische T-Zellen über ihre MHC-I-Oberflächenmoleküle kreuzpräsentieren (Chan und Housseau, 2008). Da in Tumoren häufig Zelltod stattfindet, spontan oder durch zytotoxische Effektoren, ist dies ein Weg, um tumorassoziierte Antigene dem Immunsystem zu präsentieren (Janeway und Medzhitov, 2002). Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wurde von Burnet (1970) als Immunüberwachung (*immune surveillance*) definiert.

1.5 B16 Mausmelanom-Modell

B16 ist eine murine Melanom-Zelllinie, die aus einer C57BL/6 Maus gewonnen wurde. Die Tumorzellen können *in vitro* kultiviert werden und nach subkutanem Transfer in ein syngenes Empfängertier (Haplotyp H2b) zu einem soliden Tumor heranwachsen. Zwei Sublinien konnten etabliert werden, die sie sich in ihrer Fähigkeit zu überleben und in ihrem Wachstumspotential unterscheiden. Die Linie B16.F1 bildet nach intravenöser Injektion Metastasen in der Lunge. (Fidler, 1975). Nach mehreren Passagen entstand eine zweite Tochterzelllinie (B16.F10), die bei gleicher Anzahl an transferierten Tumorzellen eine deutlich höhere Anzahl an Lungenmetastasen aufwies.

Von immunologischer Bedeutung sind bei B16.F10 Zellen die geringe Expression antigenpräsentierender MHC-Klasse I (Kb und Db) Moleküle und das Fehlen von MHC-Klasse II und costimulatorischen Molekülen wie zum Beispiel B7.1, B7.2 oder ICAM-1. Es kann jedoch die Expression von CD40 und des Adhäsionsmoleküls CD44 auf der Oberfläche der Tumorzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich kann durch die Behandlung mit Interferon- γ die Expression von MHC-Klasse I gesteigert und von MHC-Klasse II Molekülen sogar neu induziert werden. Dieser Effekt von Interferon- γ ist für die immunologische Bekämpfung von B16.F10 Zellen bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten von großer Relevanz (Böhm et al., 1998). Obwohl B16 Melanomzellen nicht immunogen sind, d.h. Mäuse nicht in der Lage sind, nach der Injektion von bestrahlten Tumorzellen das Auswachsen eines Tumors bei erneuter Applikation unbestrahlter Zellen zu verhindern, kann doch unter bestimmten Bedingungen das Immunsystem gegen die Tumorzellen aktiviert werden. Hierbei konnten natürliche NK-Zellen (Kodama et al., 1999) und zytotoxische T-Zellen (Prévost-Blondel et al., 1998) als wichtige Effektorzellen identifiziert werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Es wird kontrovers diskutiert, ob Apoptose neben einer immunologisch unauffälligen Reaktion, auch immunstimulierende Auswirkungen haben könnte. Nekrose wird häufig als eine Art von Zelltod beschrieben, die in einer Entzündungsreaktion endet. Um die spezifische Immunreaktion auf Apoptose oder Nekrose zu testen, benötigt man einen direkten Stimulus. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Apoptose und Nekrose auf das Immunsystem zu analysieren.

Dafür wurden zwei Systeme entwickelt, die über die tetracyclinregulierte Expression von Todesgenen gezielt Apoptose oder Nekrose in murinen B16-Melanomzellen auslösen können. In dem einen Zelltodmodell kann die mitochondriale Apoptose über die kurze Form des proapoptotischen BH3-*only* Proteins Bim (Bim_S) eingeleitet werden. Die Expression von Bim_S kann die Aktivierung von Bak und Bax veranlassen, wodurch die Mitochondrienmembran für Cytochrom c durchlässig wird. Dies ist ein starker Stimulus, der in der Aktivierung von Caspase 3 endet, was in der Zelle zu typischen apoptotischen Veränderungen führt. Im anderen Zelltodmodell kann der Signalweg der Nekrose über die Expression und der anschließenden Dimerisierung der Todesdomänen des Adapterproteins FADD (FADD/DD) aktiviert werden. Der Nekrosesignalweg ist noch weitgehend ungeklärt. Dennoch spielt bei der FADD/DD-induzierten Nekrose die Kinase RIP1 eine wesentliche Rolle, wodurch der Singalweg gut nachzuweisen ist.

Mit diesen Modellen haben wir die Möglichkeit, Zelltod direkt und ohne unspezifische Nebeneffekte *in vitro* und *in vivo* durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin in B16-Melanomzellen auszulösen.

Um den Einfluss von Apoptose oder Nekrose auf das Immunsystem zu testen, wurden zwei B16-Mausmodelle entwickelt. Im ersten Mausmodell wurden die Auswirkungen der Zelltodarten in etablierten B16-Tumoren auf das Immunsystem analysiert. Im zweiten Mausmodell wurden Mäuse mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert, um die Reaktion des Immunsystems auf die spezifischen Zelltodarten herauszufinden.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zell-/Mauslinien

B16

Die murine Melanom-Zelllinie B16 wird in RPMI-Medium 1640 mit 10% FCS (Tetracyclin-negativ), 50 µg/µl Penicillin/Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol und 50 µg/µl Geneticin (G-418 Sulfat) kultiviert. Die Zellen wachsen vergleichsweise schnell und müssen alle zwei Tage umgesetzt und mit frischem Medium versorgt werden.

D2SC1

D2SC1 ist eine dendritische Zellen-ähnliche Zelllinie und wird in RPMI-Medium 1640 mit 10% FCS (hitzeinaktiviert), 50 µg/µl Penicillin/Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert. Diese Zelllinie wurde in den Phagozytose-Experimenten eingesetzt.

Phoenix-Eco

Diese Zelllinie wurde zur Herstellung von Retrovirus genutzt.

293FT

Diese Zelllinie wurde zur Herstellung von Lentivirus genutzt.

Mauslinien

Für die Versuche in vivo wurden C57BL/6 Mäuse mit dem Haplotyp H2-Kb verwendet. Diese Mäuse kommen von der Firma Harlan-Winkelmann aus Borcheln. Zudem wurden OT1 TCR-transgene Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 der Hauseigenen Zucht in München eingesetzt. Diese Mäuse haben einen transgenen T Zell-Rezeptor, der spezifisch für das aus Ovalbumin abgeleitete H2-Kb-begrenzte Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) ist.

2.1.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	WB300	Mytron, Heiligenstadt
Blotkammer	Mini-Trans-Blot Cell Criterion Blotter	Bio-Rad, München Bio-Rad, München
CO ₂ Brutschrank für Zellkultur	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometriegerät	FCS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ/USA
Echtzeit-PCR-Gerät	ABI PRISM® 7700 detection system	PE Applied Biosystems, Foster City, CA/USA
Elektrophoresekammer	Mighty Small SE260 Mini-Vertical Unit	Hoefer, San Francisco, CA/USA
Entwicklungsmaschine für Western Blots	Curix 60	Agfa-Gaevert, Köln
Epifluoreszenzmikroskop		Zeiss
FACS Sorter	MoFlow	Dako, Glostrup/Dänemark
Großzentrifugen	Megafuge 1.0 R (4°C) Sorvall RC 26 Plus (4°C) Ultrazentrifuge	Heraeus, Hanau Du Pont, Newton, CT/USA
Kühlplatte	Cop 30	Melite, Burgdorf
Lichtmikroskop	ID203, Axiovert 100, 40	Leica, Carl Zeiss, Jena
Mikrotom	Microm HM 335E	Walldorf
PCR-Gerät	TRIO-Thermoblock	Biometra
pH-Meter	MultiCal pH526	WTW, Weilheim
Photometer	4054 Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala/Schweden
Spannungsquelle	EPS 1001	Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala/Schweden
Sterilwerkbank	HERAsafe HSP 18	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C (RT) Biofuge 15 R (4°C) Biofuge fresco (4°C) Omnifuge 2.ORS (RT)	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
UV-Transluminator	Eagle Eye™ II-Still Video System	Statagene, La Jolla, CA/USA

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Accutase	PAA, Pasching/Österreich
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	Bio-Rad, München
All Blue Protein Standard	Bio-Rad, München
Ammoniumchloride (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin-V (human; Fluorochrom-Konjugat APC)	BD Pharmingen, Hamburg
Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Bio Rad Protein Assay	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blasticidin (Stock: 5 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Bovine serum albumine (BSA)	Bio-Rad Laboratories, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
CFSE (carboxy-fluorescein-diacetat, succinimidylester)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coumermycin (Stock: 50 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM	Merck, Darmstadt
Doxycyclin	Fluka , Ulm
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99 %, 70 %)	Apotheke, Klinikum re. d. Isar, München
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiummonoazidbromid (EMA)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Fetales Kälberserum (FCS) Tetracyclin-negativ	PAA, Pasching/Österreich
Fetales Kälberserum (FCS) ultra-low Endotoxin	PAA, Pasching/Österreich
Formaldehyde (37%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
G-418 Sulphatlösung (50 mg/ml)	PAA, Pasching/Österreich
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Glycerol	Merck, Darmstadt
GM-CSF (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>) (murin)	Überstand von mGM-CSF exprimierender Zelllinie
GolgiPlug	BD Pharmingen, Hamburg
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Heparin	Roche, Mannheim
HEPES	Fluka, Ulm
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Interleukin-2 (IL-2) (murin)	Roche, Mannheim
Magermilchpulver	Fluka, Ulm
Methanol (MeOH) (99%)	Merck, Darmstadt
Mikrosphären MP (OVA+CpG)	A. Heit, München
Mineralöl	Sigma- Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel/Schweiz
Natriumhydroxid (NaOH) (0,2 N, 10 N)	Apotheke, Klinikum re. d. Isar, München
Nekrostatin-1	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ovalbumin (Hühnchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin 100x konzentriert (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAA, Pasching/Österreich
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching/Österreich
Polybrene	Sigma-Aldrich, München
Poly (I:C)	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibierungs-Cocktail	Roche, Mannheim
RPMI 1640 1x	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 1x	PAA, Pasching/Österreich
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München
Staurosporin (Sts)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Foster City, CA/USA

Synthetische Oligopeptide OVA257-264 (SIINFEKL)	Biosyntan (Berlin)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	Bio-Rad, München
Tetracyclin	Fluka, Ulm
Tetramer H2-Kb/SIINFEKL	D.H. Busch, München
Triton X-100	Bio-Rad, München
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, München
Tween 20 (Polyethylensorbitan Monolaureat)	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Morphisto, Frankfurt a. M.
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
	Bachem, Bubendorf/Schweiz

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Proteingröße	Hersteller
Anti-Bim	Bim _{EL} (33 kDa) Bim _L (25 kDa) Bim _S (15 kDa)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus aktive Caspase 3	12 kDa, 17 kDa	Abcam, Cambridge/USA
Anti-HMGB1	30 kDa	Abcam, Cambridge/USA
Anti-Maus β -Actin	50 kDa	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus PARP	89 kDa, 116 kDa	Cell Signalling, New England Biolabs (FFM)
Ziege-anti-Maus	-	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen	-	Dianova, Hamburg

2.1.4.1 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-Maus CD3 ϵ -APC	145-2C11	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus CD3 ϵ	145-2C11	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus CD62L-FITC	MEL-14	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus CD8a-APC	53-6.7	Invitrogen Caltag, Karlsruhe
Anti-Maus CD8a-PE	53-6.7	Invitrogen Caltag, Karlsruhe

Anti-Maus CD16/CD32 (Fc-Block)	2.4G2	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus CD62L-PE (L-Selektin, LECAM-1, Ly-22)	MEL-14	Invitrogen Caltag, Karlsruhe
Anti-Maus CD11b-PE	M1/70	eBioscience, San Diego/USA
Anti-Maus CD11c-APC	N418	eBioscience, San Diego/USA
Anti-Maus CD40-PE	1C10	eBioscience, San Diego/USA
Anti-Maus CD45R/B220-FITC	RA	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus CD80-PE (B7.1)	16-10A1	eBioscience, San Diego/USA
Anti-Maus CD86-PE (B7.2)	GL1	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus IFN- γ -FITC	XMG1.2	BD Pharmingen, Hamburg
Anti-Maus IFN- γ -PE	XMG1.2	BD Pharmingen, Hamburg

2.1.5 Laborbedarf

Beschreibung	Hersteller
Cryoröhrchen (Cryo-Vial FS, 1 ml)	Peske & Co, Aindling-Arnhofen
Deckgläschen (24 mm x 32 mm)	Roth, Karlsruhe
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Eppendorfbehälter (1,5 ml)	Zefa, Harthausen
FACS-Röhrchen	Peske & Co, Aindling-Arnhofen
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Nitrozellulosemembran (0,2 μ m)	Whatman, Protan Schleicher & Schuell, Dassel
	Peske & Co, Aindling-Arnhofen
Objektträger Defrost Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Braun, Melsungen
Petrischalen (50 mm, 100 mm)	Sigma-Aldrich, München
Photographischer Film (Kodak)	Corning
Pipetten 'Cellstar' (1-25 ml)	Roth, Karlsruhe
	Zefa, Harthausen
Sterile Filter (0,45 μ m)	Biotech, Göttingen
Spritze (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Spritze (Omnifix-F 1 ml)	Braun, Melsungen
Whatman Filterpapier (3 mm)	Whatman, Maidstone/England
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-)	Falcon

Lochboden)	
Zellkulturplatten (10 cm, 15 cm)	Falcon
Zellfilter (100 µm)	Falcon

2.1.6 Puffer

Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
Annexin-V-Puffer	HEPES/NaOH pH 7,4	10 mM
	NaCl	140 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
6 x DNA-Ladepuffer	Saccharose	40 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
FACS-Puffer	BSA in PBS	0,5 % (w/v)
4x Laemmli-Puffer	Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM
	SDS	70 mM
	DTT	5% (v/v) 1M
	Glycerol	10% (v/v)
	Bromphenolblau	1 mg/ml
NP-40 Lyse-Puffer	Tris/HCl pH 8,8	20 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)
	Proteaseinhibitor-Cocktail	1 Tablette
Ponceau-S	Ponceau-S	2 mg/ml
	Perchlorsäure	0,3 %
	Essigsäure	10 %
Sammelgel für SDS-Gel pH 6,8	Tris Base	0,5 M
	HCl	0,5 M
	SDS	0,4%
	Polyacrylamid	5%
	APS	100 µl auf 10 ml Puffer
	TEMED	10 µl auf 10 ml Puffer
SDS-Laufpuffer	Tris Base	0,25 M
	Glycin	1,918 M
	SDS	1%

SDS-Probenpuffer	Tris-HCl	100 mM (pH 6,8)
	β -Mercaptoethanol	5%
	SDS	5%
	Bromphenolblau	0,2%
	Glycerin	20%
TAC (Erythrozyten-Lysepuffer)	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	90 % (v/v) 170 mM
	Tris/HCl	10 % (v/v) 170 mM
50 x TAE Puffer	Tris base	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	EDTA	50 mM
	Aqua dest.	auf 1 l auffüllen
1x TBS	Tris/HCl pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
1x TBS-T	Tris/HCl pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween ₂₀	0,1 % (v/v)
Trenngel für SDS-Gel pH 8,8	Tris Base	1,5 M
	HCl	0,3 M
	SDS	0,4%
	Polyacrylamid	10%, 12%, 15%
	APS	100 μ l auf 10 ml Puffer
	TEMED	10 μ l auf 10 ml Puffer
WB Transfer-Puffer	Tris	20 mM
	Glycin	154 mM
	MeOH	20% (v/v)
WB Laufpuffer	Tris	50 mM
	Glycin	384 mM
	SDS	3,5 mM
WB Blockierungspuffer	Magermilchpulver in 1 x TBS-T	5 % (w/v)

2.1.7 Kits

Einsatz	Kit-Name	Hersteller
Agarose-Gelextraktion	QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

DNA-Isolierung	Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System	QIAGEN, Hilden
DNA-Aufreinigung	Wizard® SV Gel und PCR Clean-up System	QIAGEN, Hilden
	Gateway	
DNA-Ligation	DNA Ligation Kit	Takara Bio, Berkeley, CA/USA
Klonierungsreaktion	TOPO® Klonierungsreaktion	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Transfektionsreagent	FuGENE® HD Transfektionsreagent BD	Roche, Mannheim
WB-Entwicklungerlösung	ECL Chemoluminiszent-Substrat GE	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden
Zellfixierung/ Zellpermeabilisierung	Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Lösungs-Kit inkl. Golgi Plug and BD Perm/Wash 10x	BD Biosciences, Hamburg
Zelllinker	PKH67 grüner Fluoreszenz-Zell-Linker, Mini-Kit für generelle Zellmembran-Markierung PKH26 roter Fluoreszenz-Zell-Linker, Mini-Kit für generelle Zellmembran-Markierung	Sigma-Aldrich, München
Zellsortierung	Miltenyi MACS purification kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.8 Molekulargewichtsmarker

Marker	Bezeichnung	Hersteller
SDS-PAGE	Seebblue Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
DNA	1 kB DNA Extension Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Protein-Marker	Page Ruler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas

2.1.9 Computer-Software

Name	Entwickler
CellQuest™ Pro	BD Biosciences, Hamburg
FlowJo 6.4.1	TreeStar, Inc., Ashland/USA
Graph Pad Prism 4	GraphPad Software, Inc., San Diego/USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung des Nekrose- und Apoptosekonstruks

Der eukaryotische Expressionsvektor (pcDNA4/TO/myc-HisA) wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI geschnitten. Durch Einsetzen des Inserts FLAG-3xGyraseB über DNA-Ligation wurde das Fusionsprotein pcDNA4/TO/FLAG-3xGyraseB hergestellt. Anschließend wurde an die GyraseB das Insert FADD/DD kloniert. Aus diesem Vektor (pcDNA4/TO/FLAG-3xGyraseB-FADD/DD) wurde über eine PCR mit den Primern FLAG (vorwärts) und FADD/DD (rückwärts) das Fragment FLAG-3xGyraseB-FADD/DD amplifiziert und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Das Fragment liegt bei einer Größe von ca. 2500bp. Über das Wizard® SV Gel und PCR Clean-up System von QIAGEN wurde das Fragment aufgereinigt und über eine Gateway Reaktion von Invitrogen in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO nach Herstellerangaben kloniert. Anschließend wurde die TOPO® Klonierungsreaktion in den kompetenten Bakterienstamm TOP 10 transformiert und auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Eine PCR (Go Taq von Promega) wurde von 18 gepickten Klonen mit den Primern M13 (vorwärts) und FADD/DD (rückwärts) durchgeführt. Das analytische Agarosegel zeigte zwei Klone bei einer Größe von ca. 2500 bp. Diese beiden Klone wurde über das Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System von QIAGEN aufgereinigt und zum Sequenzieren verschickt. Die DNA enthielt die richtige Sequenz (pENTR/SD/D-TOPO-NFLAG-3xGyraseB-FADD/DD).

Anschließend wurde der *Entry clone* pENTR/SD/D-TOPO/N-FLAG-3xGyraseB-FADD/DD (Nekrosekonstrukt) oder der *Entry clone* pENTR/SD/D-TOPO-Bim_S (Apoptosekonstrukt) in den Vektor pLenti4/TO-V5-DEST von Invitrogen kloniert.

In die Plasmid-DNA pLenti4/TO/V5-DEST aus dem Vira Power T-REx lentiviralen Expressionssystem von Invitrogen wurde über eine Gateway-Reaktion (*LR recombination reaction*) der *Entry clone* pENTR/SD/D-TOPO/N-FLAG-3xGyraseB-FADD/DD oder der *Entry clone* pENTR/SD/D-TOPO-Bim_S kloniert und in den *E. coli* Bakterienstamm *One Shot Stbl3* über eine Hitzeschockreaktion transformiert. Die Plasmid-DNAs besitzen eine Ampicillin-Resistenz, sodass die transformierten Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten wachsen konnten. Einige Klone sind auf diesen Platten gewachsen, d.h. sie besaßen das Nekrosekonstrukt (pLenti4/TO/V5-N-FLAG-3xGyraseB-FADD/DD) bzw. Apoptosekonstrukt (pLenti4/TO/V5-Bim_S). Mit Hilfe des *Miniprep DNA Purification Systems* wurden die DNAs isoliert und zum Sequenzieren verschickt. Die sequenzierten aufgereinigten DNAs wurden nun mit Hilfe von

293 FT Zellen in einen Lentivirus transformiert. Die Zellen produzierten Lentiviren, die die Plasmid-DNA enthielten und gaben die Lentiviren in den Überstand ab. Mit diesem Überstand konnten B16-Zellen infiziert werden, die nach Selektion das Plasmid stabil trugen (siehe Abschnitt 2.2.2.3).

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Herstellung eines Plasmidvektors wurde die entsprechende DNA in folgendem Ansatz mit Restriktionsendonukleasen geschnitten.

1 µg DNA
 1 µl Restriktionsenzym (oder Doppelverdau mit 2 x 1 µl Enzym)
 4 µl 10 x Puffer

Anschließend wurde der Restriktionsansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert und je nach Art des Restriktionsenzym konnte der Ansatz zur Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65 °C erhitzt werden.

Ligation von DNA

Zur Ligation von komplementären DNA-Fragmentüberhängen nach einem Restriktionsverdau wurde das DNA Ligation Kit von Takara Bio (Berkeley, CA/USA) nach Herstellerangaben eingesetzt. Anschließend wurde die DNA in der Polymerasekettenreaktion amplifiziert.

PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zur Vervielfältigung von DNA wurde das PCR Kit von Promega eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

5x green GoTaq Reaktionspuffer	10 µl (2 mM)
PCR Nukleotidenmix	5 µl (10 mM)
Upstream Primer	0,5 µl
Downstream Primer	0,5 µl
Go Taq DNA-Polymerase	0,25 µl
Template DNA	1 µl
Aqua dest.	auf 50 µl auffüllen

Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überzogen und folgendes Programm gestartet:

Schritt	94 °C	10 min
Schritt	80 °C	Pause
Denaturierung	94 °C	1 min
Anlagerung	60 °C	1 min
Synthese	72 °C	2 min
Schritt	4 °C	Pause

Die Reaktionsschleife von Schritt 3 bis 5 wurde 35 Mal wiederholt.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann DNA ihrer Größe nach aufgetrennt und analysiert werden. Dazu wurden 1-2 % Agarose in 1 x TAE-Puffer angerührt und mit 0,8 g/ml Ethidiumbromid in eine Gelkammer ausgegossen. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und trennten sich nach Anschluss des Gels an eine 120 V starke Spannungsquelle in 1 x TAE-Puffer ihrer Größe nach auf. Um die Größe der DNA oder deren Fragmente zu bestimmen, wurde der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder eingesetzt.

Wenn man ein bestimmtes DNA-Fragment isolieren möchte, kann dies mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten werden. Zur Isolierung der DNA wurde das QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde spektralphotometrisch als Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach den Formeln in µg/ml:

Konzentration RNA = $A_{260 \text{ nm}} \times \text{Faktor } 40$

Konzentration DNA = $A_{260 \text{ nm}} \times \text{Faktor } 50$

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ermittelt. Unter dem Lichtmikroskop wurden 4x4 Felder ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhielt man die Zellzahl pro ml Medium.

2.2.2.2 Herstellung von B16TREx

Die Expression von Bim_S und der FADD-Todesdomäne in B16-Zellen wird durch ein Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbares System kontrolliert, welches auf dem ViraPower T-REx Lentiviralen Expressionssystem von Invitrogen basiert.

Zunächst wurden Lentiviren hergestellt, die das Expressionsplasmid tragen. Dies erfolgte über die Zelllinie 293 FT.

Das Expressionsplasmid wird mit dem ViraPower Packaging Mix in einem Verhältnis von 1:3 gemischt und in 1,5 ml DMEM-Medium aufgenommen. Dann werden 36 µl Lipofectamin 2000 in 1,5 ml DMEM-Medium gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Lipofectamin-Mix zu dem DNA-Mix gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden 6×10^6 293 FT- Zellen in 5 ml DMEM-Medium ausgezählt. Nach der Inkubationszeit wird der Transfektionsansatz in eine 10 cm-Kulturschale mit 5 ml DMEM-Medium gegeben und die ausgezählten 293 FT-Zellen werden hinzupipettiert. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und durch 6 ml DMEM (mit 10% Tet-freiem FCS und Pen/Strep) ersetzt. Nun bilden sich in den 293 FT-Zellen Viruspartikel, die das Expressionsplasmid enthalten. Diese werden in den Überstand abgegeben. Zwei Tage später kann der Virusüberstand abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert werden.

Um B16-Zellen lentiviral mit dem gewünschten Plasmid zu transduzieren, werden sie in 100% Virusüberstand aufgenommen und ausgesät. Zur besseren Virusinfektion werden 5-6 µg Polyprene hinzugegeben.

Stabile B16TREx-Zellen wurden über eine lentivirale Transduktion des pLenti6/TetRepressor hergestellt. Das Konstrukt enthält eine Blastizidin-Resistenz, wodurch Zellen, die den Tet-Repressor nicht integriert haben, ausselektioniert werden. Es wurde eine Konzentration von 5 µg/ml Blastizidin austitriert.

2.2.2.3 Herstellung von B16TREx-Bim_S und B16TREx-FADD/DD

Die durch Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare Expression von Bim_S oder FADD/DD basiert auf dem ViraPower TREx lentiviralen Expressionssystem von Invitrogen.

Transiente Transfektion von Bim_S

Um Apoptose direkt auszulösen, wurde eine B16-Zelllinie hergestellt, die Bim_S Tet-reguliert exprimiert. Dafür wurde die kürzeste Form des pro-apoptotischen Proteins Bim (Bim_S) in den pLenti4/TO/V5-DEST kloniert. Da die lentivirale Transduktion von Bim_S in B16TREx- Zellen nicht erfolgreich war, wurde eine stabile Zelllinie durch transiente Transfektion hergestellt, die durch 2 µg/ml Zeocin selektioniert wurde. Es besteht eine polyklonale Zelllinie, die Bim_S nach Tetracyclin-Induktion (1µg/ml) exprimiert.

Lentivirale Transduktion von FADD/DD

Für die direkte Induktion von Nekrose, wurde die Todesdomäne (DD) des humanen Adapterproteins FADD verwendet, die am C-Terminus mit drei Kopien der Gyrase B aus *E.coli* versehen wurde. Durch Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin wird das Protein exprimiert und durch 1 µM Coumermycin (CM) (Sigma-Aldrich) dimerisiert die Gyrase B. Dadurch fusioniert auch die *death domain* von FADD und wird somit aktiviert. Das Konstrukt, das am N-terminalen Ende ein Flag-tag besitzt, wurde in den Vektor pLenti4/TO/V5-DEST kloniert. Das Nekrosekonstrukt pLenti4/TO/3xGyr-FADD-DD konnte lentiviral in B16TREx-Zellen transduziert werden. Einzelne Klone wurden mit 2 µg/ml Zeocin ausselektioniert und getestet.

Die beiden Zelllinien stehen während der Zellkultur unter Selektion mit Blasticidin für den Tet-Repressor und mit Zeocin für das entsprechende Todesgen Bim_S oder FADD/DD.

2.2.2.4 Herstellung von B16Bim_S-Ova und B16FADD/DD-Ova

Um Ovalbumin (Ova) stabil in den Zellen zu exprimieren, wurde Ova-cDNA in einen MIGR1 Vektor kloniert und retroviral in B16Bim_S und B16FADD/DD transduziert.

Herstellung von Retroviren

Die Ovalbumin-cDNA (Ova-Volllänge aus dem Hühnchen) wurde in den retroviralen Expressionsvektor pMIG kloniert, der mit einer IRES-Sequenz und einer GFP-cDNA, der der Selektion dient, ausgestattet ist. Für die Virusproduktion wurde eine Phoenix-Eco-Zelllinie genommen, die einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen auf eine 10cm-Zellkulturschale ausgesät wurde, um eine Zelldichte von 50-80 % zu bekommen. Der Transfektionsansatz wurde folgendermaßen angesetzt:

7,5 µg pMIG-OVA Vektor
2,5 µg pCLEco packaging Vektor
in 500 µl DMEM-Medium

Anschließend wurden 40 µl FuGENE HD Transfektionsreagent vorsichtig in den Ansatz pipettiert und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Phoenix-Eco-Zellen gegeben. Nach 6 bis 8 Stunden bei 37°C wurde das Transfektions-Medium abgenommen und durch 6 ml frisches DMEM-Medium ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium, in dem sich die Viruspartikel befinden, in einem 15 ml Falcon gesammelt, bei 3000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Filter gefiltert. Aliquots zu je 1 ml können bei -80°C aufbewahrt werden.

Retrovirale Transduktion von Ovalbumin

Bevor die B16-Zellen mit dem Ova-haltigen Retrovirus infiziert werden können, wurden sie 24 Stunden vorher mit 0,5 µg/ml Tunicamycin behandelt, das die Transduktionseffizienz erhöht. 2×10^5 B16-Zellen wurden ausgezählt und bei 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1ml des retroviralen Überstandes resuspendiert und in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Zur Unterstützung der Transduktion wurde 5µg/ml Polypren zu jedem Ansatz gegeben und die Platte wurde bei 1800 rpm für 90 min bei 32°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit 1 ml B16-Kulturmedium aufgefüllt und weiter bei 37°C inkubiert. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen auf GFP-positive Zellen im FACS getestet und sortiert. Dadurch kann die Transduktionseffizienz festgestellt werden. GFP dient als Indikator für Ovalbumin-exprimierende Zellen. Die Zelllinien werden im Folgenden als B16Bim_S-Ova und B16FADD/DD-Ova bezeichnet.

2.2.2.5 Nachweis von Zelltod

Nachweis der Zellmembranintegrität (PI, Annexin V)

Der Zelltod kann durch den Verlust der Plasmamembranintegrität ermittelt werden. Wenn die Plasma- und Kernmembran zerstört ist, kann Propidiumjodid an DNA-Fragmente binden. Zusätzlich kann eine Färbung mit dem FITC-markierten Annexin V gemacht werden. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, dass bei Zelltod von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite gestülpt wird.

Zur einfachen Propidiumjodid-Färbung werden die Zellen trypsiniert und 1x mit PBS gewaschen. 5 µg/ml Propidiumjodid wird zu den Zellen gegeben und sofort im FACS Calibur gemessen.

Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wird eine gleichzeitige Annexin V/Propidiumjodid-Färbung durchgeführt. Die Zellen werden geerntet und mit PBS gewaschen. Anschließend werden 1×10^6 Zellen in 50 µl Bindepuffer gelöst und 2,5 µl Annexin V-FITC und 3 µl Propidiumjodid (Stock: 1mg/ml) hinzugegeben. Die Zellen werden vorsichtig gevortext. Die Proben werden auf Eis für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 200 µl Annexin V-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben werden im FACS Calibur analysiert.

Analyse der Zellkernmorphologie (Hoechst 33342 -Färbung)

Zellkerne können mit Hilfe des durch UV-Licht anregbaren Farbstoffs Hoechst 33258 gefärbt werden. Hoechst kann in die DNA interkalieren. Dies macht eine Detektion von lebenden und toten Zellen möglich, da diese eine Chromatinkondensation und -fragmentation aufweisen.

Induzierte B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 1 µg/µl Hoechst 33342 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und im Epifluoreszenz-Mikroskop analysiert.

2.2.2.6 Einsatz des RIP1-Inhibitors Nekrostatin-1

Nekrostatin-1 blockiert die Kinase RIP1, die den Nekrosesignalweg über die Todesdomäne des Adapterproteins FADD (FADD/DD) aktiviert. Durch Inhibierung von RIP1 wird der nekrotische Zelltod verhindert. B16FADD/DD- und B16Bim_S-Zellen wurden für 6 h bzw. 24 h mit Tetracyclin bzw. Tetracyclin und Coumermycin induziert und gleichzeitig mit 100 µM

Necrostatin-1 behandelt. Anschließend wurde die Membranintegrität durch Propidiumjodid-Färbung getestet und im FACS analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinanalyse im Westernblot

SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine ihrer Molekülmasse nach aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Sambrook und Russel (1989) durchgeführt. Alle Proben wurden mit demselben Volumen Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proteine konnten durch eine diskontinuierliche Natrium-Dodezyl-Sulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

Zuerst werden die Gelkammern aufgebaut, wobei vorher alle Glasplatten und Kammern mit 70% Ethanol gesäubert wurden. Das Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung des Trenngels (Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid) richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine, wobei man für große Proteine einen geringeren Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid benötigt. Das Trenngel wird bis zu 3/4 zwischen die Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Ethanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist und das Ethanol abgenommen wurde, übergießt man es mit dem Sammelgel und platziert einen 10-Taschen-Kamm in der Mitte des Sammelgels. Nun werden die mit SDS-Ladepuffer versetzten Proben bei 95°C für 5 min aufgekocht. Nach Polymerisierung des Sammelgels befestigt man die Gele in der Laufkammer und füllt 1 x Laufpuffer in den Behälter. Der Kamm wird gezogen und die Taschen mit max. 30 µl Probenflüssigkeit beladen.

Als Marker dient der Page Ruler Prestained Protein Ladder von Fermentas, von dem ca. 10 µl in die erste Tasche pipettiert werden. Nun werden die Gele an ein elektrisches Feld angeschlossen und anfangs bei 60-80 V für das Sammelgel und anschließend bei 120-140 V für das Trenngel für ca. 1 bis 1 1/2 Stunden stehen gelassen. Die Proteine sind aufgetrennt, wenn die blaue Lauffront an der unteren Gelkante angelangt ist.

Westernblot

Um Proteine zu detektieren, wird ein Westernblot durchgeführt, bei dem die Proteine aus der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet werden. Dann können die Proteine mit Hilfe einer Entwicklungsmaschine auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Je 4 Lappen, 4 Filterpapiere und eine Nitrozellulose-Membran pro Blotkammer müssen in Transferpuffer eingeweicht werden. Der Transfer wird folgendermaßen aufgebaut: Man beginnt mit der Kathode (schwarze Seite), auf die ein Schaumstofflappen gelegt wird. Dann folgen 2 dünne Filterpapiere, auf die das SDS-Gel luftblasenfrei geschichtet wird. Auf das Gel wird die Membran ebenfalls luftblasenfrei gelegt und die 2 Filterpapiere und der Schaumstofflappen schließen mit der Anode (weiße Seite) ab. Bei diesem Aufbau ist darauf zu achten, dass alle Stücke gut aufeinander passen und genügend mit Transferpuffer befeuchtet sind. Dieser „Sandwich“ wird so in die Transferkammer geschoben, dass die schwarze Seite gegen die schwarze Wand gerichtet ist. Die Kammer wird mit Kühlakku versehen und mit Transferpuffer aufgefüllt. Im Kühlraum wird nun die Kammer für 1 1/2 Stunden an eine Stromquelle bei 100 mA angeschlossen. In dieser Zeit werden die Proteine auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Danach wird die Membran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und wenn nötig mit Ponceaus angefärbt, um sie zu schneiden. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch und reversibel an Proteine und lässt sich mit Wasser wieder vollständig entfernen. Dann wird die Membran 2 x 5 min in TBST₂₀ gewaschen. Dann folgt die Blockierung der Proteine in 10% Magermilch/BSA für 1 h bei RT. Nach der Blockierung wird die Membran 3 x für 10 min mit TBST₂₀ gewaschen und somit für den ersten Antikörper vorbereitet. Der Primärantikörper wird je nach Herstellerangaben 1:1000 in 3% BSA in TBST₂₀ verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag muss die Membran intensiv ca. 5 x mit TBST₂₀ gewaschen werden, bevor der zweite Antikörper eingesetzt wird. Der Sekundärantikörper wird jedes Mal neu hergestellt. Er wird je nach Herstellerangaben verdünnt und eingesetzt, und für 50-60 min bei RT auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation muss die Membran nochmals gründlich für mindestens 1 h gewaschen werden. Dabei wird das TBST₂₀ 7-10 x gewechselt.

Um die Membran zu entwickeln und die Proteine auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen, wird sie für 1 min in ECL-Detektionslösung (gleiches Volumen der Lösung 1 und 2) gegeben. Dann wird die ECL-Detektionslösung wieder abgenommen und die Membran muss luftblasenfrei zwischen zwei Folien in die Filmkassette gelegt werden. Ab jetzt muss in der

Dunkelkammer bei Rotlicht gearbeitet werden. Die Exponierzeit variiert je nach Stärke des Signals. Nun entwickelt man den Film in der Entwicklermaschine.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1. Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDC)

Um Knochenmarkszellen zu isolieren, wurden der Femur und die Tibia von C57BL/6-Mäusen genommen und mit einem Skalpell von umliegendem Gewebe und Muskeln befreit. Anschließend wurden die Epiphysen abgeschnitten und mit RPMI-Medium mit Hilfe einer sterilen Spritze durchgespült. Die Knochenmarkszellen wurden mit dem Medium in einer Petrischale aufgefangen. Dies wurde mehrfach wiederholt, bis die Knochen vollständig ausgespült waren. Die Zellen wurden mit dem Medium in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei 1500rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml frischem RPMI mit 10 % GM-CSF resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Nach 3 Tagen wird das Medium mit weiteren 10 ml Medium mit 10 % GM-CSF aufgefüllt. Ab Tag 6 sind die Zellen zu dendritischen Zellen ausdifferenziert und können bis Tag 10 für ein Experiment eingesetzt werden.

2.2.4.2 Aufnahme von toten B16-Zellen durch D2SC1 bzw. BMDCs

Um zu testen, ob dendritische Zellen tote B16-Zellen phagozytieren, wurde ein Aufnahme-Experiment gestartet. Dafür wurden eine DC-ähnliche Zelllinie (D2SC1) und frisch isolierte und differenzierte Knochenmarks-DCs (BMDCs) verwendet.

Zunächst werden 5×10^6 B16-Bim_S oder B16-FADD/DD Zellen in 100 µl Diluent C aufgenommen. 2 µl des grünen Fluoreszenz-Zelllinkers PKH67 wurden mit 98 µl Diluent C vermischt (1:5 in Ethanol vorverdünnt) und zu den Zellen gegeben. Diese wurden für 3 min bei Raumtemperatur markiert. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 200 µl FACS-Puffer für 1 min gestoppt, bevor 200 µl RPMI-Medium zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachdem die gefärbten Zellen 2 x mit PBS gewaschen wurden, konnten 3×10^5 Zellen/Loch in eine 6-Loch-Platte ausgesät werden. Die D2SC1-Zellen wurden mit dem roten PKH26 Zelllinker wie oben beschrieben markiert.

Nach Zelltodinduktion mit Tetracyclin wurden 1×10^5 Zellen geerntet und zusammen mit 1×10^5 DCs (rot gefärbten D2SC1 oder ungefärbten GM-CSF BMDCs) in einer 96-Loch-Platte in einem Endvolumen von 200 μ l RPMI 1640 für 24 h inkubiert.

Da die Färbemethode mit dem PKH Zelllinker für BMDCs zu belastend ist, wurden die BMDCs erst nach Cokultivierung mit toten Zellen gefärbt. Zunächst wurden unspezifische Antikörper durch einen FC-RII/III Antikörperblock für 30 min auf Eis blockiert. Anschließend fand die Färbung mit einem PE-markierten CD11c Antikörper für weitere 30 min auf Eis statt. Die Aufnahme von toten B16-Zellen durch die D2SC1-Zelllinie und durch BMDCs konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden.

2.2.4.3 Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf dendritischen Zellen

Wenn dendritische Zellen totes Zellmaterial phagozytieren, kann dies eine Reifung der dendritischen Zellen verursachen. Um dies zu testen, wurden Reifungsmarker auf der Oberfläche von dendritischen Zellen angefärbt und analysiert.

2×10^5 Knochenmarks-DCs (BMDCs) wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen für 24 Stunden bei 37°C in einer 50 mm Petrischale in 3 ml RPMI 1640 Medium mit 10% GM-CSF kultiviert. Die BMDCs wurden anschließend mit dem FC-RII/III Antikörperblock für 30 min auf Eis inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. BMDCs wurden dann mit den Antikörpern anti-CD11c-APC und entweder mit dem Antikörper anti-CD86-PE- oder mit dem anti-CD40-PE-Antikörper für 30 min auf Eis gefärbt. Die Zellen wurden im FACS analysiert.

2.2.4.4 Proliferationsassay von T-Zellen

Erylyse von Milzzellen

Zunächst wird eine Einzelzellsuspension von Splenozyten aus der Milz hergestellt. Dabei wurden die Milzen aus OT1-transgenen Mäusen entnommen, mit einem Stempel durch ein Sieb gepresst und in einer Petrischale aufgefangen. Die Suspension wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Ammoniumchloridpuffer pro Milz aufgenommen und die Erythrozyten wurden für 10 min bei RT lysiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml PBS gewaschen, in 200 μ l PBS/0,5%BSA aufgenommen und in eine Spitzbodenplatte überführt. Nun stehen die Zellen für weitere Versuche zur Verfügung.

Isolierung von CD8⁺ OT1-T-Zellen

Aus Milzen von OT1-TCR-transgenen Mäusen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Um OT1-T-Zellen aus dem Zellgemisch spezifisch herauszufiltern, wurde ein negatives Auswahlverfahren mit einem Miltenyi MACS Purification Kit angewandt.

Magnetpartikel werden mit Antikörpern gegen spezifische Epitope von Oberflächenmarkern versehen. Anschließend wird die Zellsuspension mit den Magnetpartikeln inkubiert und gewaschen. Dann wird die Suspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule aufgetragen, die an einen Dauermagneten gebunden ist. Zellen, die mit Magnetpartikeln über die Antikörper verbunden sind, bleiben in der Säule hängen, während unbeladene Zellen aus der Säule ausgewaschen und aufgefangen werden.

Diese Methode wurde genutzt, um T-Zellen unmarkiert und damit im nicht aktivierten Zustand aus einer Zellsuspension zu isolieren. Dagegen werden ungewollte Zellen wie NK1.1-, MHCII- oder B220- exprimierende Zellen mit FITC gekoppelten Antikörpern markiert und über Bindung an MACS Körperchen später auf der Säule zurück gehalten. Das Zellsediment aus einer Milz wurde in 1 ml PBS/BSA (0,5% BSA) gelöst. Es wurden je 48 µl anti-B220-FITC, 12 µl anti-NK 1.1-FITC und 24 µl anti I-A/I-E-FITC Antikörper dazu gegeben. Nach 30 min bei 4°C wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS/BSA (0,5% BSA) gewaschen. Das Sediment wurde anschließend in 300 µl Puffer aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 150 µl MACS-beads, die 20 min mit den Zellen inkubierten. Dann wurden die Zellen 7 min bei 1100 rpm zentrifugiert, in 3 ml PBS/BSA (0,5% BSA) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Schließlich wurden die negativ selektierten OT1-T-Zellen in 15 ml Röhrchen aufgefangen und standen nach einmaligem Waschen mit Medium für weitere Versuche zur Verfügung.

CFSE-Markierung von T-Zellen

Isolierte OT1/CD8⁺-T-Zellen wurden 2 x mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 µM CFSE (in 1 ml PBS) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 5 ml RPMI 1640-Medium gestoppt und für 5 min im Dunkeln auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit 5 ml PBS gewaschen, bevor sie in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/96-well-Rundbodenplatte ausgesät wurden.

Proliferationsassay von OT1-T-Zellen

Zunächst wurden B16Bim_S-Ova für 6 h mit Tetracyclin (Tet) behandelt und B16FADD/DD-Ova für 24 h mit Tet und Coumermycin (CM). Die toten B16-Zellen wurden dann geerntet und einmal mit PBS gewaschen. In eine 96-well-Platte wurden 5×10^4 (bis 1×10^5) BMDCs mit der gleichen Anzahl an CD8⁺/OT1-T-Zellen pro well ausgesetzt. Hinzu kamen 5×10^4 (bis 1×10^5) Bim_S-induzierte bzw. FADD/DD-induzierte B16-Zellen. Das Endvolumen betrug 200 µl RPMI-Medium, 10 % GM-CSF und enthielt Interleukin IL-2 (10 U/ml). Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurde das Zellgemisch mit dem Antikörper anti-CD8a-APC (1:200) für 20 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt und anschließend 2 x mit PBS/0,5%BSA gewaschen. Die Proliferation der T-Zellen konnte im Durchflusszytometer analysiert werden.

2.2.4.5 Tetramerfärbung von OT1-T-Zellen

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension aus Blut, Lymphknoten oder Tumorgewebe wie oben beschrieben hergestellt. Die Zellen wurden bei 4°C für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert und in 100 µl PBS/0,5%BSA, in dem der anti-CD16/CD32-Antikörper (= FC-BlockTM 1:200) und EMA (1:2000) gelöst sind, für 20 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde ein Mastermix aus 10 µl PBS/BSA mit H2-Kb/Ova257-264 (SIINFEKL) (1:25) und PE (1:10) auf Eis im Dunkeln vorinkubiert. Nach dem FC-Block/EMA-Färbung wurden die Zellen zweimal mit je 150 µl PBS/BSA gewaschen. Der Tetramer-Mastermix wurde auf 40 µl/Probe mit PBS/BSA aufgefüllt und die Zellen wurden in dem Mix für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Oberflächenfärbung der CD8⁺-Zellen wurden 20 µl des Antikörpermixes aus anti-CD8a-APC-Antikörper und anti-CD62L-FITC (je 1:33 in PBS/BSA) zu dem Tetramer-Mix hinzupipettiert und für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Als Kontrollen wurden die Einzelfarben angesetzt (ungefärbt, CD8-PE, CD8-APC, CD62L-FITC), die zur Einstellung am Durchflusszytometer diente. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 150 µl PBS/BSA gewaschen, in 150 µl PBS/BSA mit 2 % PFA fixiert und in FACS-Röhrchen überführt, in denen 150 µl PBS/BSA vorgelegt waren. Die Proben können bei 4°C aufbewahrt werden oder sofort im FACS analysiert werden.

2.2.4.6 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Blut und der Milz

Zunächst wurde aus der Schwanzarterie von C57BL/6 oder von OT1-transgenen Mäusen ca. 200 µl Blut mit einer 1 ml-Omnifix-F Spritze, die 50 µl Heparin enthält, entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm wurde das Pellet

mit 1 ml TAC-Lysispuffer vorsichtig resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt. 5 ml TAC-Lysispuffer wurden hinzugegeben und die Erythrocyten wurden für 10 min bei RT lysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium gestoppt und auf Eis gestellt.

2.2.4.7 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Restimulation von Splenozyten mit synthetischen Oligopeptiden

Zur Peptidstimulierung von isolierten Milzzellen wurden 4×10^6 Splenozyten in 200 μ l RPMI-Medium in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen einer Spendermaus mit 50 μ l des 5 x Mastermix mit 5 μ l/ml Brefeldin A und des Peptidmix in einer Endkonzentration von 1 μ l/ml versetzt. Brefeldin A ist ein Lacton-Antibiotikum, das zur Untersuchung des Proteintransportes eingesetzt wird. Es verursacht durch Interferenz im Transport vom Golgiapparat zum Endoplasmatischen Retikulum die Akkumulation von Proteinen, wie zum Beispiel von Interferon- γ im Endoplasmatischen Retikulum.

Die Zellen wurden zusätzlich mit dem Antikörper anti-CD3 ϵ (1:200) versetzt, um eine unspezifische Produktion von Interferon- γ zu stimulieren. Die Zellen wurden gut gemischt und für 5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einige Zellen wurden als Kontrolle der Einzelfarben (FITC, PE, APC) eingesetzt.

Vorbereitung der Splenozyten für Intrazelluläre Zytokinfärbung

Nach der Inkubationszeit zur Peptidstimulierung wurden die Milzzellen in eine 96-Loch-Spitzbodenplatte überführt und 5 min bei 1500 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 100 μ l FACS-Puffer (PBS/0,5% BSA) mit EMA (1:2000) und FC-Block (1:100) resuspendiert und für 20 min auf Eis unter Lichtbestrahlung inkubiert. Anschließend mussten die Zellen 2,5 x mit PBS/5%BSA gewaschen werden. Zwischendurch wurden die Zellen für 2 min bei 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nun konnten die Zellen mit den Antikörpern α CD8-APC (1:250) und α CD62L-PE (1:250) gefärbt werden. Dafür wurden die Zellen in 50 μ l Antikörpersuspension aufgenommen und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend mussten die Zellen 2,5 x mit je 150 μ l Perm/Wash permeabilisiert und gewaschen werden. Dann wurden die Zellen mit 100 μ l Cytofix/Cytoperm für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend 1,5 x mit 1x Perm/Wash gewaschen.

Intrazelluläre Interferon- γ Färbung

Zur Intrazellulären Zytokinfärbung wurde der Antikörper α -IFN γ -Fitc (1:500) eingesetzt. Die Zellen wurden in 50 μ l Antikörpersuspension für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, anschließend 2,5 x mit 1x Perm/Wash gewaschen und in 1 % PFA fixiert. Die Zellen konnten dann im FACS analysiert werden.

2.2.4.8 Zytotoxizitätsassay

Für den Zytotoxizitätsassay benötigt man die Milz aus einer naiven Maus, deren Splenozyten nach CFSE-Markierung in drei Versuchsmäuse injiziert werden.

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension von Splenozyten aus der Milz hergestellt. Dabei wurden die Milzen aus naiven Mäusen entnommen, mit einem Stempel durch ein Sieb gepresst und in einer Petrischale aufgefangen. Die Suspension wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Ammoniumchloridpuffer pro Milz aufgenommen und die Erythrozyten wurden für 10 min bei RT lysiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml PBS gewaschen, in 200 μ l PBS/0,5%BSA aufgenommen, in eine Spitzbodenplatte überführt und können gezählt werden.

Es wurden 5 ml Zellsuspension pro Maus eingesetzt. Für ein Rechenbeispiel nehme ich acht naive Mäuse, d.h. 40 ml Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde in zwei gleiche Teile getrennt, also in jeweils 20 ml. 20 ml der Suspension 1 wurde mit 20 ml SIINFEKL-Lösung (10⁻⁷ M in Medium) versetzt. 20 ml der Suspension 2 wurde mit 20 ml an peptidfreiem Medium versetzt. Die beiden Suspensionen wurden für 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit 20 ml PBS (ohne FCS/BSA) gewaschen. Zwischendurch wurden die Suspensionen für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert.

Für die Markierung der Zellen mit CFSE wurden 5 x 10⁷ Zellen pro ml CFSE eingesetzt. Wenn man also 6 x 10⁸ Zellen insgesamt hatte, benötigte man für zwei Ansätze 3 x 10⁸ Zellen, also 6 ml CFSE. Suspension 1, die mit dem SIINFEKL-Peptid versetzt wurde, wurde mit einer hohen Konzentration an CFSE (5 μ M CFSE) inkubiert. Suspension 2, die ohne Peptid blieb, wurde mit einer niedrigen Konzentration an CFSE (0,5 μ M CFSE) inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 37 °C. Anschließend wurden jeweils 25 ml Medium hinzugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Suspensionen zweimal mit 20 ml PBS gewaschen, bevor beide Suspensionen (1+2) miteinander gemischt wurden. Zur Injektion der Milzzellen, die aus einem Gemisch von SIINFEKL-Peptid/CFSE^{hoheKonz.} und unmarkierten/CFSE^{niedr.Konz.} bestanden, wurden i.v. 200 μ l pro Versuchsmaus eingesetzt. Am

nächsten Tag wurde das Blut aus der Schwanzarterie der Versuchsmäuse entnommen und im FACS analysiert. Im Ergebnisteil ist das beschriebene Mausmodell in einer Skizze zusammengefasst.

2.2.5 Methoden im Mausmodell

2.2.5.1 Injektion

Subkutane Injektion von B16-Zellen und Zelltodinduktion

B16 Zellen (2×10^5 B16-Bim_S oder B16-OVA-Bim_S bzw. 5×10^5 B16-FADD/DD oder B16-OVA-FADD/DD in 50 µl PBS) wurden subkutan (s.c.) in die rechte Flanke von sechs bis zehn Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen injiziert. Vor der Injektion wurden die Tumorzellen trypsiniert und mit 5 ml PBS gewaschen. Wenn der Tumor eine Größe von etwa 5 mm² erreichte, wurde die Expression von Bim_S bzw. FADD/DD durch die intraperitoneale Injektion von 200 µg Doxycyclin (Dox) in 200 µl PBS induziert. Um die Dox-Konzentration aufrecht zu halten, wurde in späteren Experimenten die Dox-Injektion am nächsten Tag wiederholt.

2.2.5.2 Tumoranalyse

Tumorvermessung

Nach Injektion von B16Bim_S- oder B16FADD/DD-Zellen in die rechte Flanke von C57BL/6-Mäusen wurde das Tumorwachstum über den Zeitraum des Versuchs nachverfolgt. Die Größe des Tumors wurde mit Hilfe eines Messschiebers durch Aufnahme der Breite und Länge ermittelt. Anschließend wurde das Volumen des Tumors berechnet.

Fixierung und Einbettung von Tumorgewebe

Paraformaldehyd (PFA) wurde zur Fixierung von Tumorgewebe eingesetzt. Unter Rühren wurde das PFA in auf ca. 60°C angewärmten aqua bidest gegeben und mit einigen Tropfen NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die frisch isolierten Tumoren wurden in eine Einbettkassette gelegt und in Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Anschließend konnte das Gewebe in PBS bei 4°C aufbewahrt werden. Um das Gewebe in Paraffin einzubetten, musste es in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Anschließend wurde der

Alkohol durch ein Intermedium (Xylol) entfernt und dann durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Dann konnte das Gewebe in ein Gießschälchen gelegt und mit heißem Paraffin übergossen werden. Nach Erkalten des Paraffins konnte der Block aus der Gießform gelöst werden. Um Gewebeschnitte von wenigen Mikrometern Dicke herzustellen, wurden die Paraffinblöcke in ein Rotations- oder Schlittenmikrotom eingespannt. Mit Hilfe einer schafften Klinge konnte man die gewünschte Dicke zuschneiden. Der Schnitt wird dann mit einem feuchten Pinsel vorsichtig abgehoben und in einem Wasserbad geglättet. Anschließend kann er auf einen Objektträger aufgezogen werden. Zur besseren Haftung werden die Schnitte bei 37°C in einem Brutschrank getrocknet und können anschließend beliebig gefärbt werden.

Herstellung von Paraffinschnitten

Das Tumorgewebe wurde direkt nach Entnahme mit einem Skalpell halbiert und in 4 % PFA bei 4°C über Nacht fixiert, anschließend in PBS gewaschen und wieder über Nacht im Brutschrank getrocknet. Dann wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet, bevor es mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten wurde. Im Wasserbad wurde der Schnitt (3 µm) auf einen Objektträger übertragen. Nachdem der Schnitt getrocknet war, konnten die Färbungen durchgeführt werden.

H&E-Färbung

Um die Gewebeschnitte mit Hämalun und Eosin zu färben, wurden sie 2 x 5 min mit HistoClear behandelt, bevor sie mit einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 3 min Ethanol 100% - 96% - 70%) entwässert wurden. Anschließend folgte die 10 minütige Färbung mit Hämalun (n. Mayer). Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte 10 min von überschüssiger Farbe befreit, bevor die Färbung mit ethanolischem Eosin (0,33%) für 5 min gemacht werden konnte. Anschließend wurden die Schnitte in Isopropanol für 25 sec gehalten, bevor sie in 96 % Ethanol für 25 sec inkubiert wurden. Am Ende wurden die Gewebe mit HistoClear 2 x für 3 min gesäubert, bevor sie unter Deckgläschen fixiert wurden.

Analyse der Gewebeschnitte

Die Tumorgewebeschnitte wurden nach der H&E-Färbung unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von x 400 auf die Anzahl an Apoptosen in 10 Haupt Gesichtsfeldern (HPF) ausgezählt.

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Zur Analyse der Ultrastruktur von B16-Zellen wurden B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Sodium-Cacodylat-Puffer (pH 7,4) fixiert und in Epoxydharz (Epon 812) eingebettet. Es wurden hauchdünne Schnitte angefertigt, die unter einem EM 10 CR Transmissionselektronenmikroskop von Zeiss analysiert werden konnten.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von B16Bim_S und B16FADD/DD

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Induktion der Apoptose ein Plasmid mit der kurzen Form des proapoptotischen BH3-*only* Proteins Bim (Bim_S) in die murine Melanom-Zelllinie B16 transfiziert und konnte tetracyclinreguliert überexprimiert werden. Die Aktivierung von Bim_S führt zur direkten Auslösung des mitochondrialen Apoptoseweges (O'Connor et al. 1998, Weber et al., 2007), was in den folgenden Abschnitten ausführlich nachgewiesen wird. Zur Einleitung des nekrotischen Zelltodes wurde ein Plasmid mit der verkürzten Form des Adapterproteins FADD, die nur noch die Todesdomäne enthält (FADD/DD), in die murine Melanom-Zelllinie B16 transduziert. Das System ist tetracyclinreguliert und kann durch Zugabe von Tetracyclin FADD/DD überexprimieren. Um die Todesdomäne von FADD zu aktivieren, muss das Protein dimerisieren. Dazu wurde das Nekrosekonstrukt mit 3x-Gyrase B versehen, das durch Zugabe des dimeren Antibiotikums Coumermycin (CM) dimerisiert und somit die Dimerisierung der Todesdomänen (DD) von FADD nach sich zieht (Farrar et al., 1996). Dadurch wird FADD/DD aktiviert und die Zellen sterben einen nekrotischen Zelltod, was in den folgenden Abschnitten ausführlich dargestellt wird.

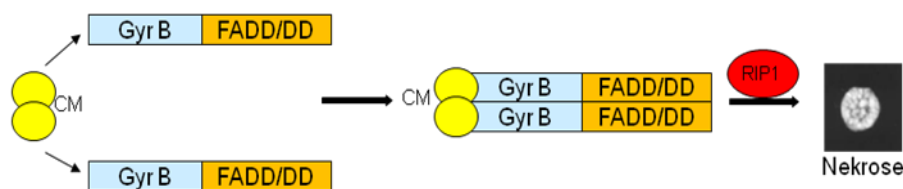


Abb.5: Nekrosekonstrukt. Durch Zugabe des dimeren Antibiotikums Coumermycin (CM) dimerisiert die Gyrase B und die Todesdomäne von FADD (FADD/DD) wird aktiviert. Nekrotischer Zelltod findet statt.

Zur Generierung der beiden Zelllinien wurden B16TREx-Zellen genommen, die ein tetracyclininduzierbares System darstellen. Die Expression der Todesgene ist durch den Tet-Repressor unterdrückt und wird durch Zugabe von Tetracyclin (Tet) bzw. Doxycyclin (Dox) gestartet.

3.1.1 Nachweis der Expression von Bim_S und FADD/DD in B16TREx-Zellen

Abbildung 6 zeigt die Expression von Bim_S und FADD/DD nach Induktion mit Tetracyclin (Tet) bzw. Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM) auf Proteinebene. Als Negativkontrolle wurde die B16-Zelllinie nur mit dem Tet-Repressor (B16TRex + Tet) aufgetragen. Das Nekroseprotein (FADD/DD + Tet/CM) hat eine Größe von etwa 90 kDa. Das Apoptoseprotein (Bim_S + Tet) hingegen besitzt nur die kurze Form von Bim (Bim_S) und hat somit eine Proteingröße von 16 kDa. Die größte Form des Proteins Bim (Bim_{EL}) erreicht eine Größe von etwa 26 kDa und wird in allen drei Zelllinien exprimiert. Endogenes Bim_{EL} dient somit als Ladekontrolle.

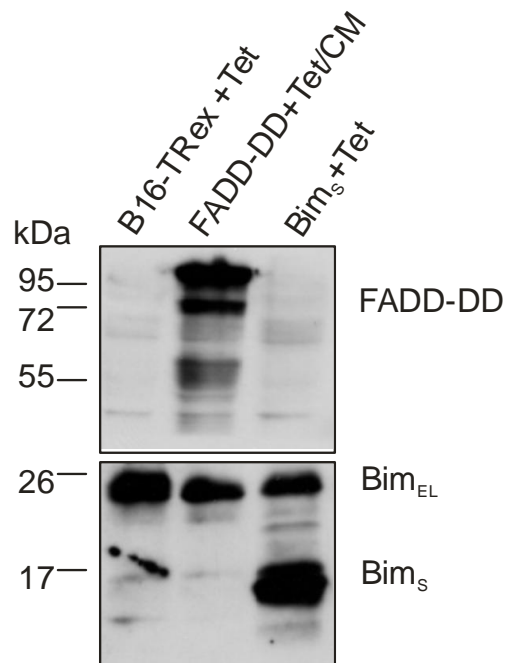


Abb. 6: Detektion von Bim_S und FADD/DD im Western Blot. Expression von FADD/DD und Bim_S in B16TREx Zellen nach Induktion mit Tetracyclin (Tet) bzw. Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM). Derselbe Blot wurde sowohl mit dem α -FADD-Antikörper (oben) als auch mit dem α -Bim_S-Antikörper (unten) inkubiert. Als Ladekontrolle dient endogenes Bim_{EL}, das in B16 Zellen exprimiert wird.

3.1.2 Morphologische Veränderungen von apoptotischen und nekrotischen B16-Zellen

3.1.2.1 Bim_S-induzierte apoptotische B16-Zellen

Eine apoptotisch sterbende Zelle zeigt typische morphologische Veränderungen. Dazu zählen ein Ablösen der Zelle vom Untergrund, das Schrumpfen der Zelle und die Kondensierung der Organellen, der Membran und des Zellkerns. Außerdem kommt es zu

einer Fragmentierung des Zellkerns und zur Degradierung der DNA. Schließlich formen die apoptotischen Zellen durch Abschnüren sogenannte apoptotische Körperchen. Diese werden durch benachbarte Zellen oder Makrophagen phagozytiert.

B16-Zellen, in denen Bim_S durch Zugabe von Tetracyclin induziert wurde, zeigen diese apoptotischen Charakteristika. In Abbildung 7 sind B16Bim_S-Zellen dargestellt, die 6 h und 24 h mit Tetracyclin (Tet) induziert und als Positivkontrolle für 6 h mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin (Sts) behandelt wurden. Bim_S-induzierte (7 C und 7 D, siehe Pfeile) bzw. Sts (7 B, siehe Pfeile) behandelte B16Bim_S-Zellen lösen sich vom Untergrund ab und weisen blasenartige Einschnürungen auf, die man als apoptotische Körperchen bezeichnet. Im Phasenkontrastmikroskop kann man ein Schrumpfen der Zellen beobachten, was ebenfalls ein typisches Merkmal für apoptotische Zellen ist. 6 h nach Bim_S-Induktion (7 C) zeigen der größte Teil der Zellen apoptotische Veränderungen. Einige Zellen bleiben jedoch adhären. Nach 24 h Bim_S-Induktion (7 D) weisen fast alle Zellen apoptotische Charakteristika auf. Unbehandelte B16-Zellen zeigen eine etwas länglichere spitz zulaufende Form und sind adhären (7 A, siehe Pfeil).

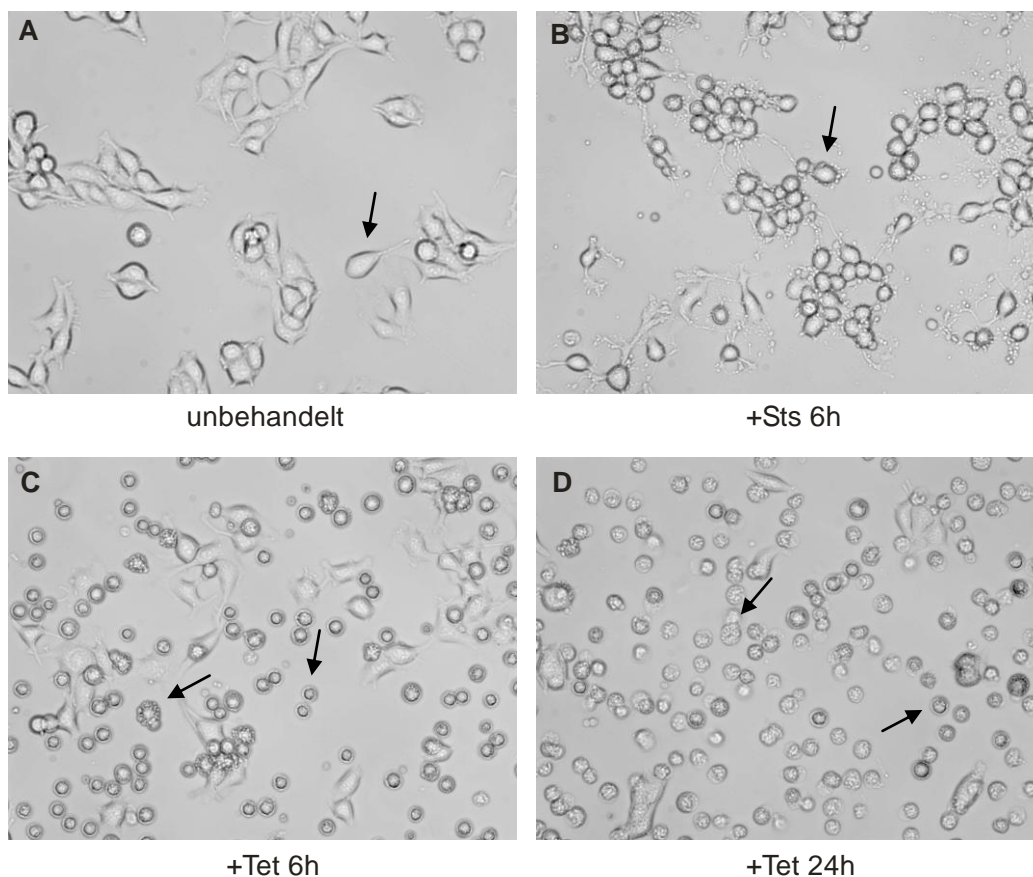


Abb.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von B16Bim_S-Zellen 6 h und 24 h nach Tetracyclin-Gabe. Als Kontrolle wurden die B16Bim_S-Zellen für 6 h mit Staurosporin (Sts) behandelt. A zeigt unbehandelte B16Bim_S-Zellen. Mit Staurosporin (B) behandelte und Bim_S-induzierte (C, D) B16Bim_S-Zellen weisen bereits nach 6 h apoptotische Charakteristika auf. Die Vergrößerung der Lichtmikroskopischen Aufnahmen beträgt 10-fach.

In Abbildung 8 ist die Ultrastrukturanalyse von B16Bim_S-Zellen dargestellt. In Abbildung 8 B sind Bim_S-induzierte B16-Zellen zu sehen, die nach 6 h ein Schrumpfen der Zellen und die Kondensierung und Fragmentierung der Zellkerne aufweisen. Dies sind typische morphologische Veränderungen in apoptotischen Zellen. In Abbildung 8 A sind unbehandelte B16Bim_S-Zellen dargestellt, die eine normale Morphologie zeigen. Die Zellen liegen in einem dichten Zellgewebe und die Kompartimente und der Zellkern weisen unauffällige Strukturen auf.

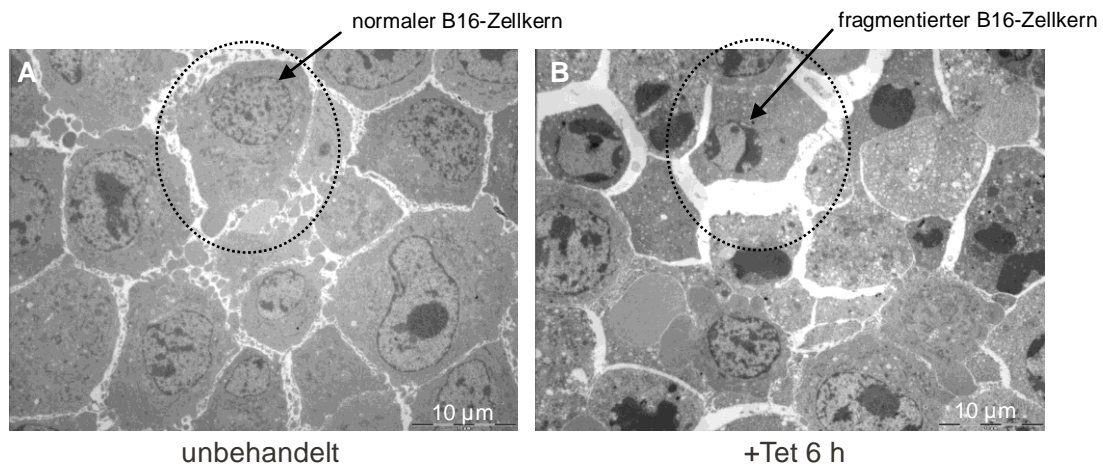


Abb.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten B16Bim_S-Zellen (A) und B16Bim_S-Zellen, in denen für 6 h Bim_S mit Tetracyclin induziert wurde (B). Bim_S-induzierte B16-Zellen (B) zeigen ein Schrumpfen der Zellen und fragmentierte Zellkerne auf. Die Größenanzeige ist im Bild jeweils unten rechts angegeben.

In Abbildung 9 ist die Kernmorphologie von B16Bim_S-Zellen abgebildet. Um die nuklearen Veränderungen in apoptotischen B16-Zellen deutlich zu machen, wurden die Zellen mit dem Chromatin-Farbstoff Hoechst 33258 behandelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In Abbildung 9 B ist ein Zellkern einer B16Bim_S-Zelle abgebildet, die für 6 h mit Tetracyclin behandelt wurde. Es ist deutlich ein Schrumpfen des Zellkerns (Karyopyknose) und eine Kernfragmentierung (Karyorrhexis) zu erkennen. Es werden also durch die Induktion von Bim_S apoptotische Kernveränderungen verursacht. Abbildung 9 C zeigt als Positivkontrolle einen B16Bim_S-Zellkern, der mit UV-Licht bestrahlt wurde, wodurch eine Fragmentierung des Zellkerns verursacht und die Zelle in Apoptose geführt wird. In Abbildung 9 A ist ein unbehandelter B16Bim_S-Zellkern dargestellt, der eine normale Morphologie aufweist.

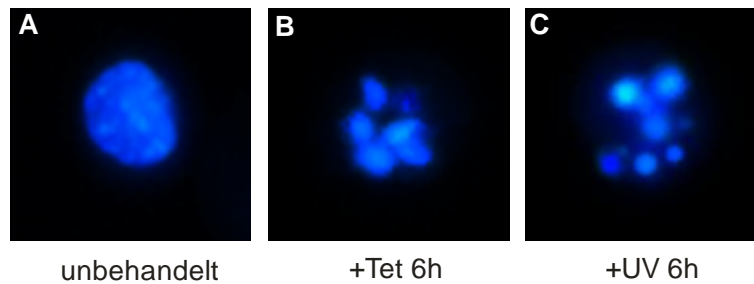


Abb.9: Zellkernfragmentierung in Bim_S-induzierten B16-Zellen. B16Bim_S-Zellen wurden für 6 h mit Tetracyclin behandelt und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Positivkontrolle wurden B16Bim_S-Zellen mit UV-Licht bestrahlt.

In Abbildung 10 wurden B16Bim_S-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 behandelt, der an Chromatin bindet und somit den Zellkern sichtbar macht. Apoptotische Zellkerne zeigen Fragmente auf, die durch die Färbung mit Hoechst 33258 deutlich von gesunden Zellkernen zu unterscheiden sind. Diese wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Abgebildet ist in Abbildung 10 die Prozentzahl an apoptotischen B16Bim_S-Zellkernen, d.h. B16Bim_S-Zellen, die einen fragmentierten Zellkern aufweisen. Bim_S-induzierte B16-Zellen zeigen etwa 60% an Zellen auf, die nach 6 h einen fragmentierten Zellkern besitzen.

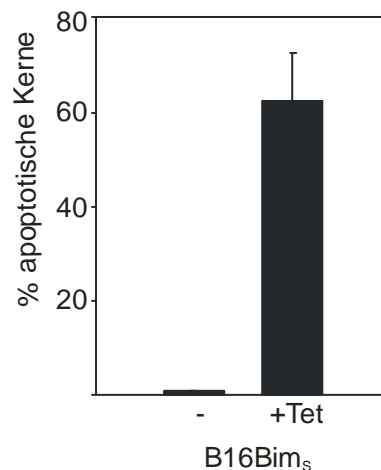


Abb.10: Zelltodinduktion in Bim_S-induzierten B16-Zellen. Bim_S wurde für 6 h mit Tetracyclin (Tet) induziert. Die Zellen wurden mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst angefärbt und nur fragmentierte Zellkerne von apoptotischen B16-Zellen wurden ausgezählt. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Ausgezählt wurden jeweils 100 Zellen aus drei zufällig ausgewählten Bereichen (insgesamt 300 Zellen pro Ansatz).

Abbildung 11 zeigt die Größenveränderung von apoptotischen B16Bim_S-Zellen im Vergleich zu unbehandelten B16Bim_S-Zellen. Das Vorwärtstreulicht (FSC-H) im Durchflusszytometer gibt Auskunft über die Größe von Zellen. Je größer eine Zelle ist, desto höher ist das

Vorwärtsstreulicht. Während der Apoptose nehmen die Zellen in ihrer Größe ab. In Abbildung 11 sind Bim_S-induzierte B16-Zellen blau und unbehandelte B16Bim_S-Zellen schwarz markiert. Man kann eine deutliche Links-Verschiebung von blau markierten Zellen erkennen, was das Schrumpfen der Zellen darstellt. 53,3 % der Bim_S induzierten B16-Zellen sind kleiner als unbehandelte B16Bim_S-Zellen, was durch eine geringere Licht-Vorwärtsstreuung (FSC-H) festzustellen ist.

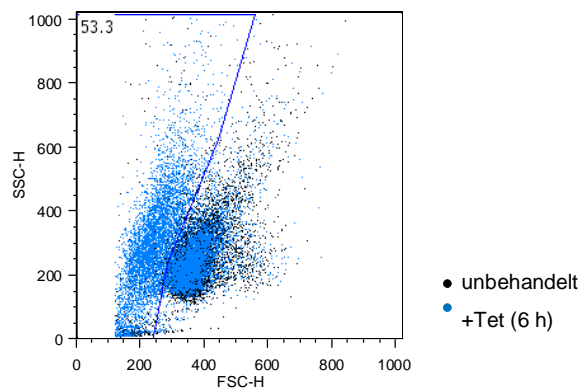


Abb.11: FACS-Analyse von B16Bim_S-Zellen, die unbehandelt (schwarz) und für 6 h mit Tetracyclin behandelt (blau) wurden. Die Analyse im Durchflusszytomer zeigt in der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung (FSC-H/SSC-H) die Bim_S-induzierte Zellpopulation, die sich in ihrer Größe verringert hat (blau). In schwarz ist die Zellpopulation von unbehandelten B16Bim_S-Zellen als Kontrolle dargestellt.

3.1.2.2 FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen

Während des nekrotischen Zelltodes vergrößert sich die Zelle mit ihren Organellen, bis es zum Aufbruch der Zellmembran und zum Verlust der Membranintegrität kommt. Dies führt zur Zelllyse. Das Zellinnere wird in das umgebende Medium abgegeben.

In Abbildung 12 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von B16FADD/DD-Zellen abgebildet. FADD/DD-induzierte B16-Zellen runden sich ab und lösen sich vom Untergrund (Abb. 12 C und D). Weitere Veränderungen der Zelloberfläche, wie zum Beispiel eine Einschnürung in apoptotische Körperchen sind nicht zu erkennen. Unbehandelte B16FADD/DD-Zellen zeigen eine normale spitz zulaufende Morphologie von B16-Melanomzellen und sind adhärent (Abb. 12 A). Im Unterschied zu Bim_S-induzierten B16-Zellen sterben FADD/DD-induzierte B16-Zellen wesentlich langsamer. 6 h nach FADD/DD-Induktion runden sich erst sehr wenige Zellen ab und lösen sich vom Untergrund. Doch nach 24 h ist der größte Teil der Zellen nekrotisch (Abb. 12 D). Die Behandlung mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin (Sts) zeigt bei B16FADD/DD-Zellen nach 6 h (Abb. 12 B) die gleichen apoptotischen Charakteristika wie die mit Sts behandelten B16Bim_S-Zellen (Abb. 7 B).

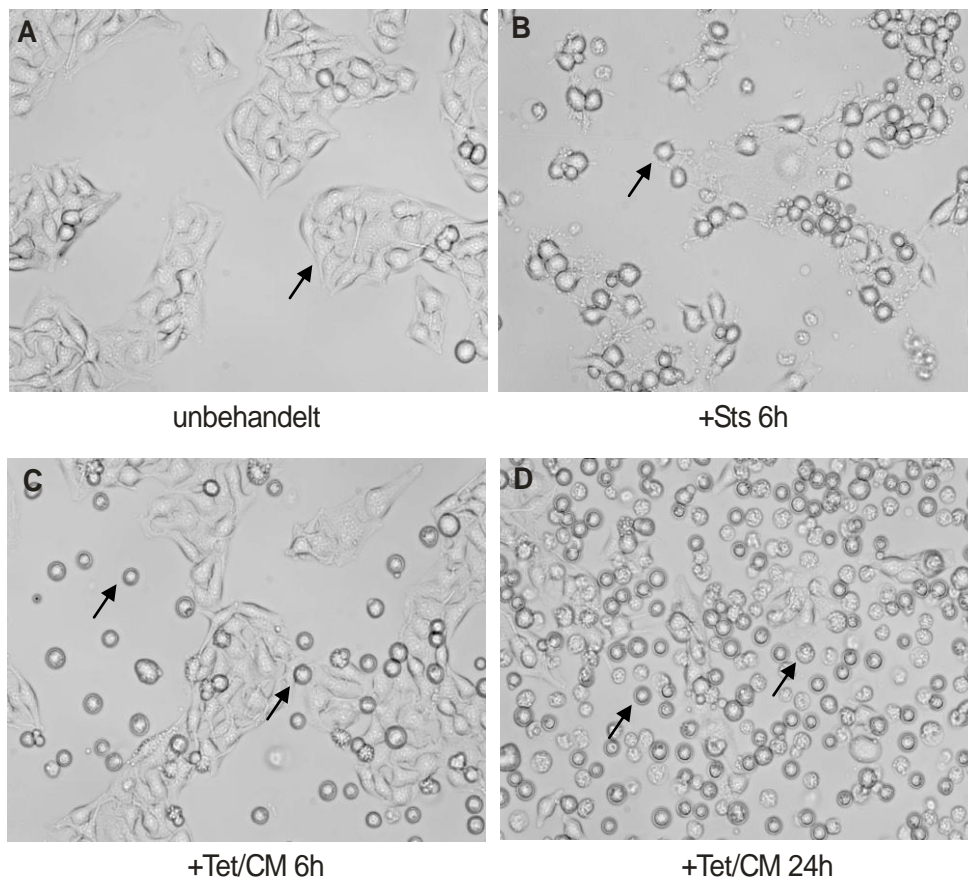


Abb.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von B16FADD/DD-Zellen, die für 6 h (C) bzw. 24 h (D) mit Tetracyclin (Tet) und Coumestrol (CM) behandelt wurden. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin (Sts) für 6 h in Apoptose geleitet. A zeigt unbehandelte B16FADD/DD-Zellen. Die Vergrößerung der lichtmikroskopischen Aufnahmen beträgt 10x.

In Abbildung 13 ist die Ultrastrukturanalyse von B16FADD/DD-Zellen dargestellt. Um die morphologischen Veränderungen in FADD/DD-induzierten B16-Zellen deutlich zu machen, wurden die Zellen unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert. In Abbildung 13 B sieht man B16FADD/DD-Zellen, die für 6 h mit Tetracyclin und Coumestrol behandelt wurden. Man kann deutlich den Verlust der Membranintegrität erkennen (siehe Markierung). Auch die Kernmorphologie ändert sich bereits nach 6 h (siehe Pfeil). In Abbildung 13 A sind unbehandelte B16FADD/DD-Zellen abgebildet, die normale Strukturen aufweisen (siehe Markierung).

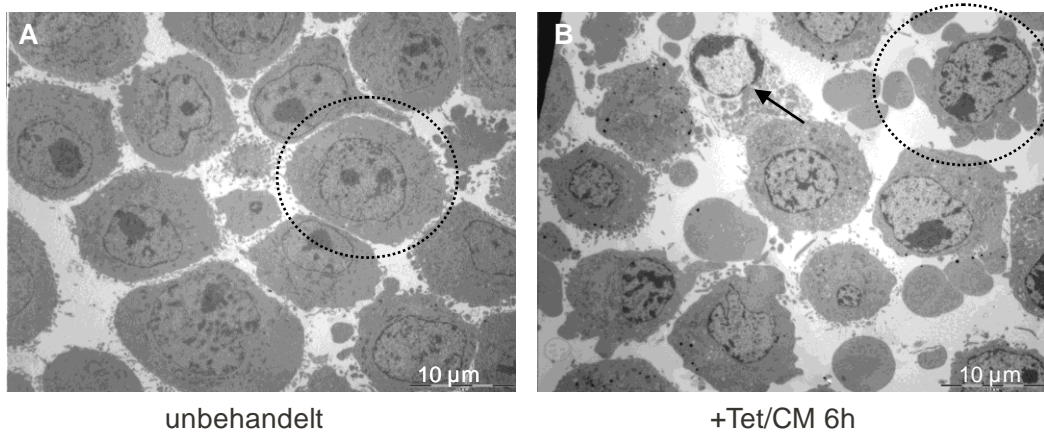


Abb.13: Ultrastrukturanalyse von B16FADD/DD-Zellen, die unbehandelt (A) bzw. für 6 h mit Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM) (B) behandelt wurden. In B sind FADD/DD-induzierte B16-Zellen zu sehen, die ein Austreten des Zytosols aus der Zelle zeigen. Die Größenanzeige ist im Bild jeweils unten rechts angegeben.

Abbildung 14 zeigt die Detailanalyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von FADD/DD-induzierten B16-Zellen. Bereits 6 h nach Induktion von FADD/DD mit Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM) konnte ein starker Austritt des Zytosols aus der Zelle beobachtet werden (Abb. 14 A, schwarzer Pfeil). In Abbildung 14 B sind B16FADD/DD-Zellen dargestellt, in denen für 24 h FADD/DD induziert und dimerisiert wurde. Diese Zellen zeigen ebenfalls einen starken Austritt des Zytosols und ein Auflösen der Zellmembran. In der Detailaufnahme in C kann man Lücken in der Zellmembran erkennen (schwarzer Pfeil). Kompartimente wie zum Beispiel der Golgi-Apparat wurden deutlich sichtbar (in Abb. 14 D, schwarze Pfeile).

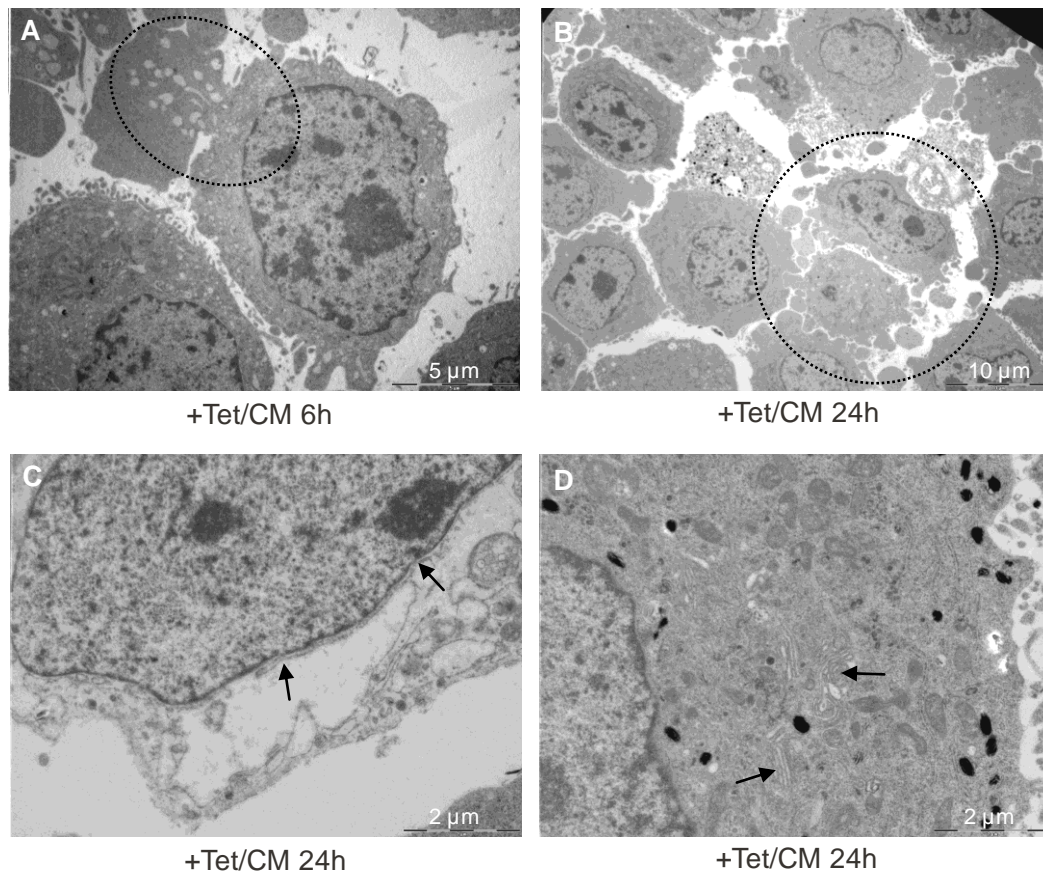


Abb.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von B16FADD/DD-Zellen, die für 6 h (A) und 24 h (B, C, D) mit Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM) behandelt wurden. A und B zeigen das Austreten des Zytosols aus den Zellen. In C ist die brüchige Zellmembran durch einen schwarzen Pfeil markiert. D zeigt eine deutliche Ausprägung des Golgi-Apparates (schwarze Pfeile). Die Größenanzeige ist im Bild jeweils unten rechts angegeben.

In Abbildung 15 ist die Kernmorphologie von FADD/DD-induzierten B16-Zellen abgebildet. Die Kernveränderungen in nekrotischen B16-Zellen konnten durch das Färben mit dem Chromatin-Farbstoff Hoechst 33258 deutlich gemacht werden. In Abbildung 15 B ist ein Kern einer B16-Zelle abgebildet, in der für 24 h FADD/DD induziert wurde. Durch die Expression und Dimerisierung von FADD/DD durch Zugabe von Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM), zeigt der Zellkern eine Veränderung des Chromatins (Abb. 15 B). Abbildung 15 A zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns einer unbehandelten B16FADD/DD-Zelle. Der Kern weist unauffällige Strukturen auf und ist oval. Zum Vergleich wurden B16FADD/DD Zellen gefrierschock behandelt. Diese Methode wird häufig benutzt, um Zellen in den nekrotischen Zelltod zu führen. Die Chromatinfärbung zeigt in diesem Fall einen diffusen DNA-Schmier (Abb. 15 C).

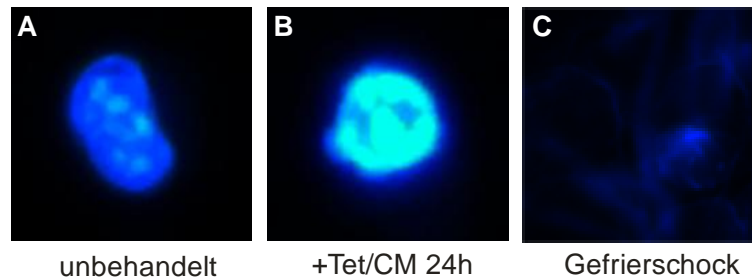


Abb.15: Veränderungen der Kernmorphologie in FADD/DD-induzierten B16-Zellen nach 24 h (B). Nach Färbung der nekrotischen B16FADD/DD-Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258, wurde eine Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht. A zeigt einen unbehandelten B16FADD/DD-Zellkern und C einen gefrierschock behandelten B16FADD/DD-Zellkern.

Abbildung 16 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von FADD/DD-induzierten B16-Zellen. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, schrumpfen die Zellen während der Nekrose nicht. Mit Hilfe des Durchflusszytometers kann eine Größenveränderung von Zellen nachgewiesen werden. Im Unterschied zu Bim_S-induzierten B16-Zellen ergab die FACS-Analyse von FADD/DD-induzierten B16-Zellen keine Größenveränderung der Zellen. Sowohl die mit Tetracyclin und Coumermycin (Tet/CM) für 24 h behandelten B16FADD/DD-Zellen (blau markiert) als auch die unbehandelten B16FADD/DD-Zellen (schwarz markiert) bleiben in der Vorwärtslichtstreuung (FSC-H) im Durchflusszytometer gleich groß (Abb. 16).

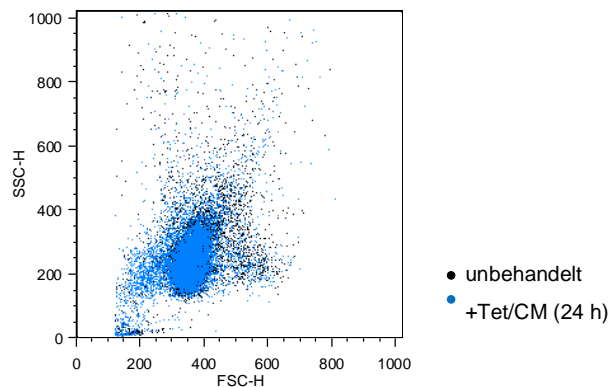


Abb.16: Durchflusszytometrische Analyse von B16FADD/DD-Zellen, die unbehandelt (schwarz) und für 24 h mit Tetracyclin und Coumermycin induziert wurden. Die Analyse im Durchflusszytomer zeigt in der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung (FSC-H/SSC-H) keine Größenveränderung der FADD/DD-induzierten im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation.

3.1.3 Lebend-Tod-Diskriminierung von Zellen durch Aufnahme von PI und Nachweis von Kern-Fragmentierung durch Bindung von PI an DNA-Fragmente

Propidiumjodid (PI) ist ein Nukleinsäureinterkalator und kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen. Intakte Membranen von lebenden Zellen können hingegen kein PI aufnehmen. Diese Eigenschaft wird in der Durchflußzytometrie zur Lebend-Tod-Diskriminierung von Zellen verwendet. PI kann auch zur Messung des DNA-Gehaltes von Zellen, zur Analyse des Zellzyklus oder zur Bestimmung von Polyploidie angewendet werden.

Abbildung 17 zeigt die FACS-Analyse von B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen, deren Membrandurchlässigkeit durch die Aufnahme von Propidiumjodid (PI) getestet wurde. Dargestellt ist die Prozentzahl von B16-Zellen, die PI-positiv sind, d.h. Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben. Bim_S-induzierte B16-Zellen weisen in etwa 60% der Zellen nach 6 h einen fragmentierten Zellkern auf (siehe Abbildung 10). Allerdings verlieren in dieser Zeit nur etwa 30 % der Bim_S-induzierten B16-Zellen ihre Membranintegrität (Abb. 17). Etwa 40 % der FADD/DD-induzierten B16-Zellen zeigen erst nach 24 h eine Durchlässigkeit der Membran. Die Daten weisen darauf hin, dass FADD/DD-induzierte B16-Zellen langsamer sterben als Bim_S-induzierte B16-Zellen.

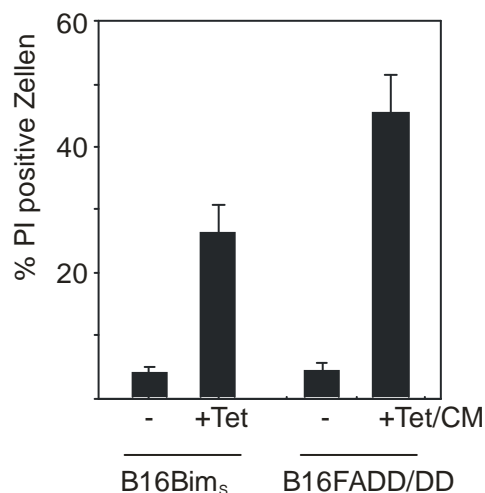


Abb.17: Zelltodinduktion in Bim_S- und FADD/DD-induzierten B16-Zellen. Bim_S wurde für 6 h und FADD/DD für 24 h induziert. In A ist die FACS-Analyse von PI-positiven B16-Zellen dargestellt. B zeigt die Auszählung von apoptotischen B16Bim_S-Zellen, die mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst angefärbt wurden. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt die FACS-Analyse von B16-Zellen nach Bim_S- bzw. FADD/DD-Induktion, die nicht permeabilisiert, sondern direkt mit Propidiumjodid behandelt wurden. Das Auftreten

von fragmentierten Zellkernen ist ein typisches Zeichen für apoptotische Zellen. Bei einer DNA-Färbung mit Propidiumjodid kann in apoptotischen Zellen ein DNA Gehalt beobachtet werden, der tiefer ist als bei einer normalen Zelle. Dies kann im Durchflusszytometer gemessen werden und wird als sub-G1-Population bezeichnet.

Das Histogramm in Abbildung 18 zeigt nur Zellen, die Propidiumjodid positiv sind, also Zellen mit einer defekten Plasma- bzw. Kernmembran. Induzierte B16Bim_S-Zellen weisen eine Sub-G1-Population von 46,9 % auf. 53,1 % der Bim_S-induzierten B16-Zellen zeigen normale Kerne in der G0/G1-Phase (2 n). Das heißt, dass sich etwa die Hälfte der PI-positiven Zellen im apoptotischen Prozess befindet. Im Falle von nekrotischem Zelltod zeigen die FADD/DD-induzierten B16-Zellen eine kleine Sub-G1-Population von 23,8 % im Gegensatz zu 76,2 % an normalen Zellkernen, die sich in der G0/G1-Phase befinden. Somit sterben auch von den FADD/DD-induzierten B16-Zellen einige auf apoptotischem Wege. Der größte Teil der Zellen lässt jedoch auf einen nekrotischen Zelltod schließen.

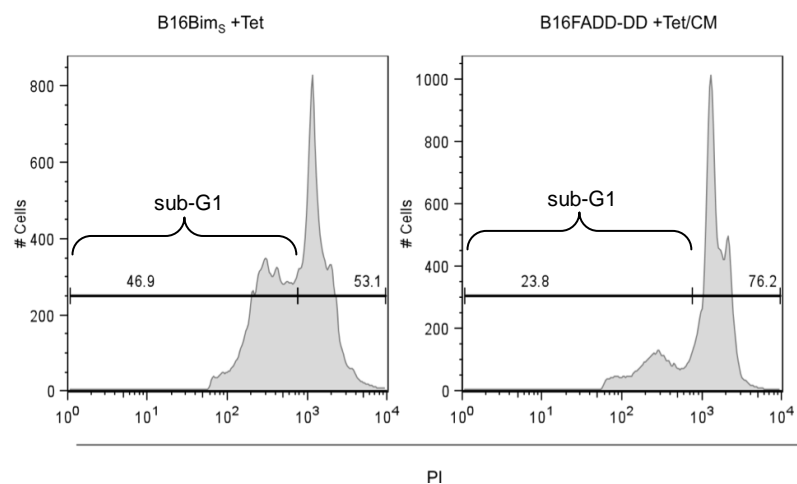


Abb.18: FACS-Analyse von apoptotischen (B16Bim_S +Tet) bzw. nekrotischen (B16FADD/DD +Tet/CM) B16-Zellen, die nicht permeabilisiert, sondern direkt mit Propidiumjodid behandelt wurden. Dargestellt ist die Anzahl an Zellen, die Propidiumjodid aufgenommen haben. Die Klammer deutet auf Zellen, deren Kerne fragmentiert sind und somit als sub-G1 Population bezeichnet werden.

3.1.4 Nachweis von Phosphatidylserin-Externalisierung und des Verlustes der Zellmembran-Integrität

Die Plasmamembran von Zellen besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, in die verschiedene Proteine eingebettet sind. Während der Apoptose wird aus der cytoplasmatischen Innenseite der Plasmamembran das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) nach außen gestülpt. Das Protein Annexin-V bindet an PS, wodurch Apoptose durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Da nekrotische Zellen ihre

Membranintegrität verlieren, kann Annexin-V ebenfalls an PS binden. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, ist eine gleichzeitige Färbung mit Propidiumjodid (PI) notwendig, das an DNA-Fragmente bindet. Zellen, die Annexin-V positiv und PI negativ sind, zeigen somit apoptotische Veränderungen. Bei Zellen, die Annexin-V und PI positiv sind, ist keine Unterscheidung zwischen spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich.

In Abbildung 19 sind B16Bim_S-Zellen (A) und B16FADD/DD-Zellen (B) abgebildet, die jeweils mit Annexin-V (x-Achse) und Propidiumjodid (PI, y-Achse) behandelt wurden. A zeigt die FACS-Analyse von unbehandelten B16Bim_S-Zellen (links) und B16Bim_S-Zellen, die für 5 h mit Tetracyclin behandelt wurden (rechts). 12,6 % Bim_S-induzierte B16-Zellen zeigen eine Annexin-V⁺/PI⁻ Population, was der frühen Apoptose entspricht. Unbehandelte B16Bim_S-Zellen weisen lediglich 3,1 % an Annexin-V positiven Zellen auf. Abbildung 19 B zeigt unbehandelte B16FADD/DD-Zellen (links) und FADD/DD-induzierte B16-Zellen (rechts), die für 15 h mit Tetracyclin und Coumermycin (Tet/CM) behandelt wurden. 13,3 % der FADD/DD-induzierten B16-Zellen sind Annexin-V⁺/PI⁺ und sind somit nekrotisch. Im Vergleich zu apoptotischen B16Bim_S-Zellen (12,6 % sind Annexin-V⁺/PI⁻) sind in FADD/DD-induzierten B16-Zellen nur 5,4 % Annexin-V⁺/PI⁻.

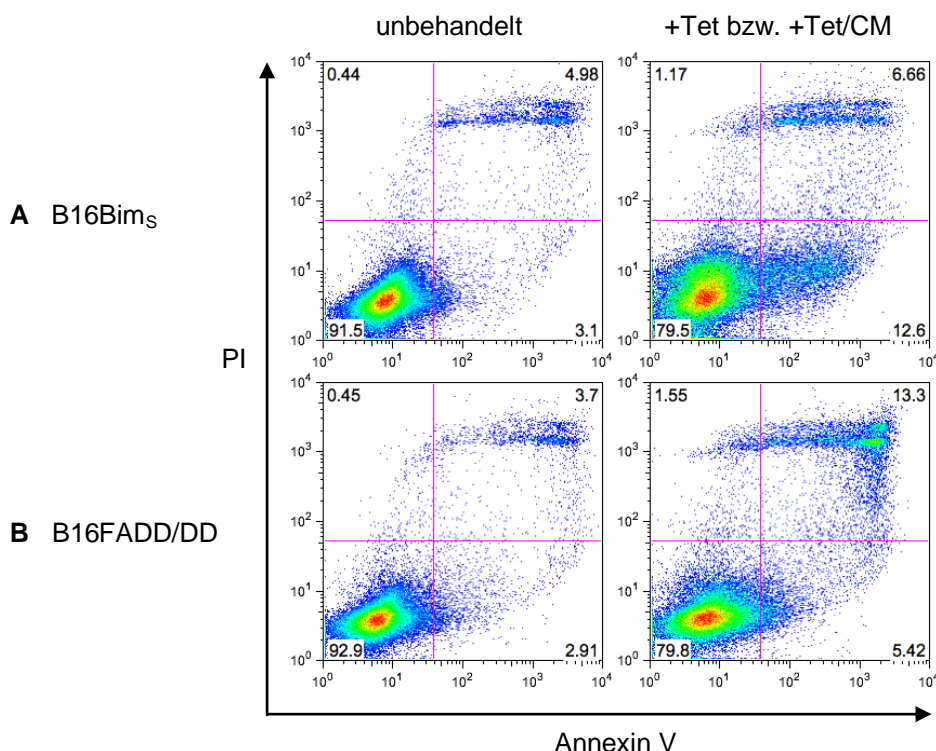


Abb.19: Zelltodanalyse von Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen. B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen wurden für 5 h bzw. 15 h mit Tetracyclin (Tet) bzw. mit Tetracyclin und Coumermycin (Tet/CM) behandelt. Anschließend wurden die Ansätze mit Annexin V und PI gefärbt und im FACS analysiert.

3.1.5 Caspasenaktivität

Abbildung 20 zeigt die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges in B16Bim_S-Zellen durch Induktion von Bim_S für 6 h mit Tetracyclin (Tet). Die inaktive Procaspase 9 bildet zusammen mit Cytochrom c und Apaf-1 das Apoptosom, wodurch die Procaspase 9 aktiviert wird. Durch die Spaltung der Procaspase 9 in ihre aktive Form entstehen die Fragmente p37 und p39 (Abb. 20). Ebenso wurde die Procaspase-3 in die Fragmente p17 und p19 gespalten und somit aktiviert. Die Spaltung des Substrates PARP in seine aktive Form zeigt ein Fragment bei einer Größe von 85 kDa.

Die Induktion von FADD/DD durch Tetracyclin (Tet) und die Dimerisierung durch Coumermycin (CM) zeigte nach 24 h ebenfalls eine leichte Spaltung der Caspasen-9 und -3 und des Substrates PARP, aber wesentlich weniger als beim Bim_S-induzierten Zelltod. Die Daten in Abbildung 20 zeigen, dass der größte Teil der FADD/DD induzierten B16 Zellen Caspasen-unabhängig stirbt. Im Bim_S-induzierten Zelltod sind die Caspasen-9 und -3 aktiv und auch das Substrat PARP ist gespalten. Durch die Behandlung beider Zelllinien (B16Bim_S und B16FADD/DD) mit Staurosporin (Sts) konnte nach 6 h ebenfalls eine Aktivierung der Caspasen- 9 und -3 und des Substrates PARP im Westenblot nachgewiesen werden. Dies diente hier als positive Kontrolle für Apoptose in beiden Zelllinien.

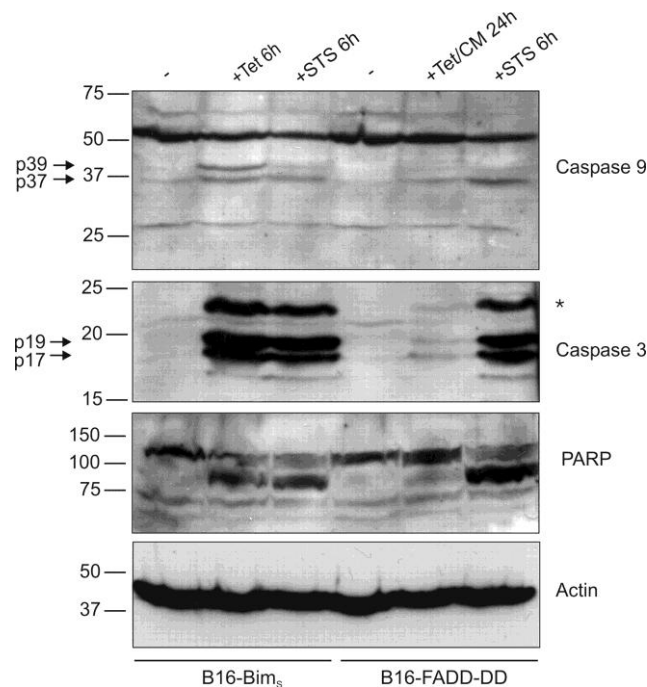


Abb.20: Caspasenaktivierung durch Induktion von Bim_S, aber nicht durch FADD/DD-Induktion. B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen wurden für 6 h bzw. 24 h mit Tetracyclin (Tetracyclin und Coumermycin) behandelt. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin (Sts) für 6 h in Apoptose geführt. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf Caspasenaktivität und PARP getestet. Caspase-9, -3 und PARP zeigen die bei der Apoptose entstehenden Spaltprodukte im Bim_S-induzierten Zelltod. * unspezifische Bande, da der Antikörper nur die aktive Caspase-3 erkennt. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

3.1.6 Inhibierung des nekrotischen Zelltodes durch Necrostatin-1

Im Nekrose-Signalweg spielen das Adapterprotein FADD und die RIP1-Kinase eine wesentliche Rolle. Degterev et al. (2005 und 2008) identifizierten Necrostatin-1 als einen Inhibitor von RIP1. Necrostatin kann den nekrotischen Zelltod blockieren (Vandenabeele et al. 2008).

In Abbildung 21 ist die Prozentzahl an toten Zellen in Bim_S-induzierten bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen nach Einsatz des RIP1-Inhibitors Necrostatin-1 dargestellt. Es wurden Bim_S- und FADD/DD-induzierte B16-Zellen mit dem RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 behandelt und auf Propidiumjodid-Aufnahme getestet. Die Daten wurden im FACS analysiert. Im Falle des Bim_S-induzierten Zelltodes sah man keine Inhibierung durch Necrostatin-1. Sowohl Bim_S-induzierte B16Bim_S-Zellen als auch solche, die mit Necrostatin-1 behandelt wurden zeigten etwa 60 % an PI-positiven Zellen. Im Falle des FADD/DD-induzierten Zelltodes konnte eine signifikante Reduktion (von etwa 60 % auf etwa 30 %) der nekrotischen Zellen nach Behandlung mit Necrostatin-1 nachgewiesen werden (Wilcoxon-Test, $p = 0,0172$). Die Blockade von RIP1 durch Necrostatin-1 führte also zur Inhibierung des FADD/DD-induzierten nekrotischen aber nicht des Bim_S-induzierten apoptotischen Zelltodes.

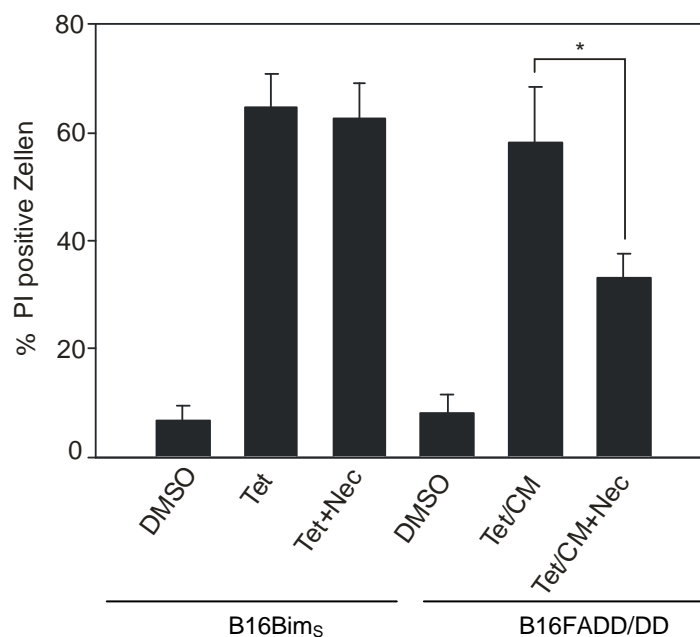


Abb.21: Necrostatin-1 blockiert den durch FADD/DD induzierten Zelltod, aber nicht die Bim_S-induzierte Apoptose. B16Bim_S und B16FADD/DD wurde für 24 h mit Tetracyclin bzw. Tetracyclin und Coumermycin behandelt. Gleichzeitig wurde 100 μ M Necrostatin-1 zu den Zellen gegeben. Der Zelltod wurde durch die Aufnahme von PI gemessen, das den Verlust der Zellmembran-Integrität darstellt. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die Inhibierung des FADD/DD-induzierten Zelltodes durch Necrostatin-1 ist nach dem Wilcoxon-Test statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0172.

3.2 Einfluss von apoptotischen und nekrotischen B16-Tumorzellen auf Immunzellen *in vitro*

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und können durch Phagozytose tote Zellen aufnehmen (Savill et al. 2002). Auf diesem Wege können sie immunsuppressive oder immunaktivierende Signale an T-Zellen weitergeben. Dendritische Zellen sind darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen und an naive T-Zellen zu präsentieren. Dadurch werden die T-Zellen aktiviert und zur Proliferation veranlasst. Dazu müssen dendritische Zellen aus einem unreifen Zustand, in dem sie nur wenige MHC-Proteine und keine costimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche besitzen, in einen reifen Zustand wechseln. In diesem Zustand können dendritische Zellen durch Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 T-Zellen zum Wachstum anregen. Auch das Oberflächenmolekül CD40, das sich auf antigenpräsentierenden Zellen befindet, kann Aktivierungssignale an T-Zellen vermitteln, wenn diese über den CD40-Liganden an CD40 auf den antigenpräsentierenden Zellen binden.

Zunächst wurde Ovalbumin (Ova) als Tumorzellassoziertes Antigen eingesetzt, da B16-Tumorzellen nur schwach immunogen sind. Um eine stärkere Immunantwort zu bekommen und somit ein sensitiveres System zur Antigenpräsentation und T-Zell Stimulation, wurden die B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zelllinien mit dem Antigen Ovalbumin transduziert (Abschnitt 3.2.1). Anschließend wurde die Phagozytose von toten B16-Zellen durch DCs getestet. Dazu wurden apoptotische bzw. nekrotische B16-Ova-Zellen zum einen mit einer dendritischen Zelllinie (D2SC1) und zum anderen mit primären dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDC) kokultiviert (Abschnitt 3.2.2 bis 3.2.3). Dann wurde die Reifung der dendritischen Zellen durch die Aufnahme von apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen durch Färben der Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 getestet (Abschnitt 3.2.4). Anschließend wurde untersucht, ob Tumorantigene aus apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen für CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentiert werden. Dies konnte durch die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.5).

3.2.1 Generierung von B16Bim_S-Ova- und B16FADD/DD-Ova-Zellen

Um stabile Ovalbumin exprimierende Zellen herzustellen, wurden die beiden Zelllinien B16TREx-Bim_S und B16TREx-FADD/DD retroviral mit dem pMIG Vektor transduziert, der die Volllänge der Huhn-Ovalbumin-cDNA und ein IRES-GFP-Konstrukt trägt. Das IRES-GFP-Konstrukt diente als Transfektionskontrolle, um die positiven Zellen zu selektionieren.

Anschließend wurden die Zellen zweimal auf GFP-positive Zellen sortiert und zeigten dann eine GFP-positive Population von ca. 85%. Der größte Teil der Zellen enthält also Ovalbumin.

Das Histogramm in Abbildung 22 zeigt die Fluoreszenzintensität von GFP in transduzierten (grün) und nicht transduzierten (schwarz) B16Bim_S-Ova- und B16FADD/DD-Ova-Zellen. GFP-positive Zellen zeigen eine höhere Fluoreszenzintensität als Zellen ohne GFP.

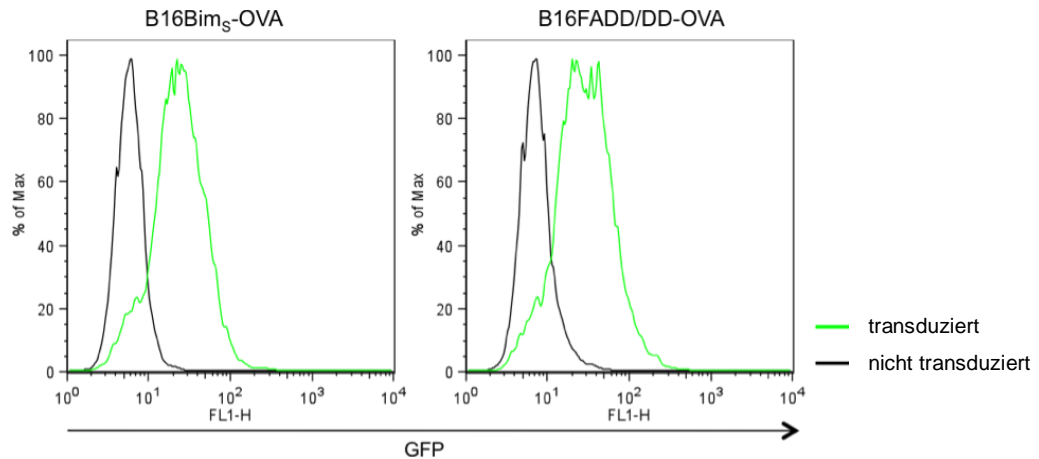


Abb.22: Expression von GFP in sortierten Ovalbumin transduzierten B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen. Das Histogramm zeigt die transduzierten Zellen in grün und als Kontrolle nicht transduzierte B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen.

In Abbildung 23 ist der Nachweis von Ovalbumin im Western Blot dargestellt. Die Proteinbande bei etwa 50 kDa entspricht dem Protein Ovalbumin, das ein Molekulargewicht von 45 kDa hat. Durch die Induktion von Bim_S für 6 h mit Tetracyclin (Tet) bzw. FADD/DD für 24 h mit Tetracyclin (Tet) und Coumermycin (CM) oder durch Behandlung der Zellen mit Staurosporin (Sts) ist keine Veränderung der Proteinexpression zu erkennen. Als negative Kontrolle wurden die nicht-transduzierten Zelllinien B16Bim_S und B16FADD/DD aufgetragen.

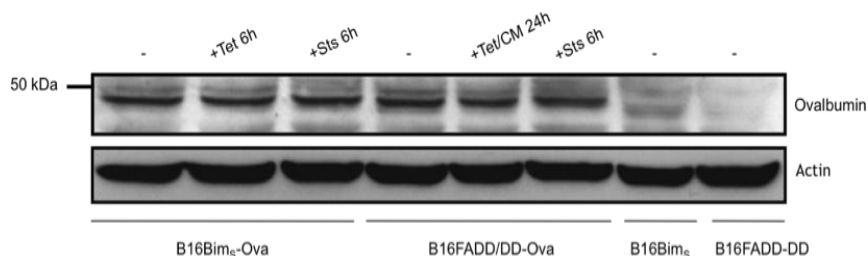


Abb.23: Nachweis der Expression von Ovalbumin nach retroviraler Transduktion in B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen. Die Westernblotanalyse zeigt die Proteine aus B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen, die unbehandelt, 6 h bzw. 24 h mit Tetracyclin bzw. mit Tetracyclin und Coumermycin oder für 6 h mit Staurosporin behandelt wurden. Die Ovalbuminexpression wird durch Zelltodinduktion nicht beeinflusst. Als negative Kontrolle dienen hier nicht-transfizierte B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin gewählt.

3.2.2 Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen durch die dendritische Zelllinie D2SC1

Um zu testen, ob tote B16-Zellen von einer dendritischen Zelllinie phagozytiert werden, wurden die beiden Zellarten verschieden angefärbt und für 24 h kokultiviert.

B16Bim_S-Ova und B16FADD/DD-Ova wurden grün gefärbt und anschließend mit Tetracyclin für 6 h bzw. mit Tetracyclin und Coumermycin für 24 h induziert. Die DC-Zelllinie D2SC1 wurde rot gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:1 zusammengesetzt und für 24 h inkubiert. Dann konnten die Zellen im Durchflußzytometer analysiert werden.

Abbildung 24 A zeigt die FACS-Analyse der Kokultivierung von unbehandelten und von induzierten B16Bim_S-Ova- bzw. B16FADD/DD-Ova-Zellen mit D2SC1-Zellen. Dargestellt sind jeweils eine Population der D2SC1-Zelllinie (FL2-H) und eine Population der B16-Zelllinien (FL1-H). Die doppeltpositive (FL1-H/FL2-H) Population steht für die Aufnahme von Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen durch die D2SC1-Zelllinie. In Abbildung 24 B ist die Lebend-Tod-Diskriminierung von unbehandelten und induzierten B16-Zellen durch die Propidiumjodid-Aufnahme dargestellt. Dies stellt eine Mischung aus intakten und nicht intakten Zellen dar. In welchem Zustand die Zellen aufgenommen und ob Zellfragmente oder ganze Zellen phagozytiert wurden, ist in diesem Versuch nicht dargestellt. Die Daten zeigen lediglich, dass sowohl Bim_S- als auch FADD/DD-induzierte B16-Ova-Zellen etwa zu gleichen Teilen von D2SC1-Zellen aufgenommen wurden.

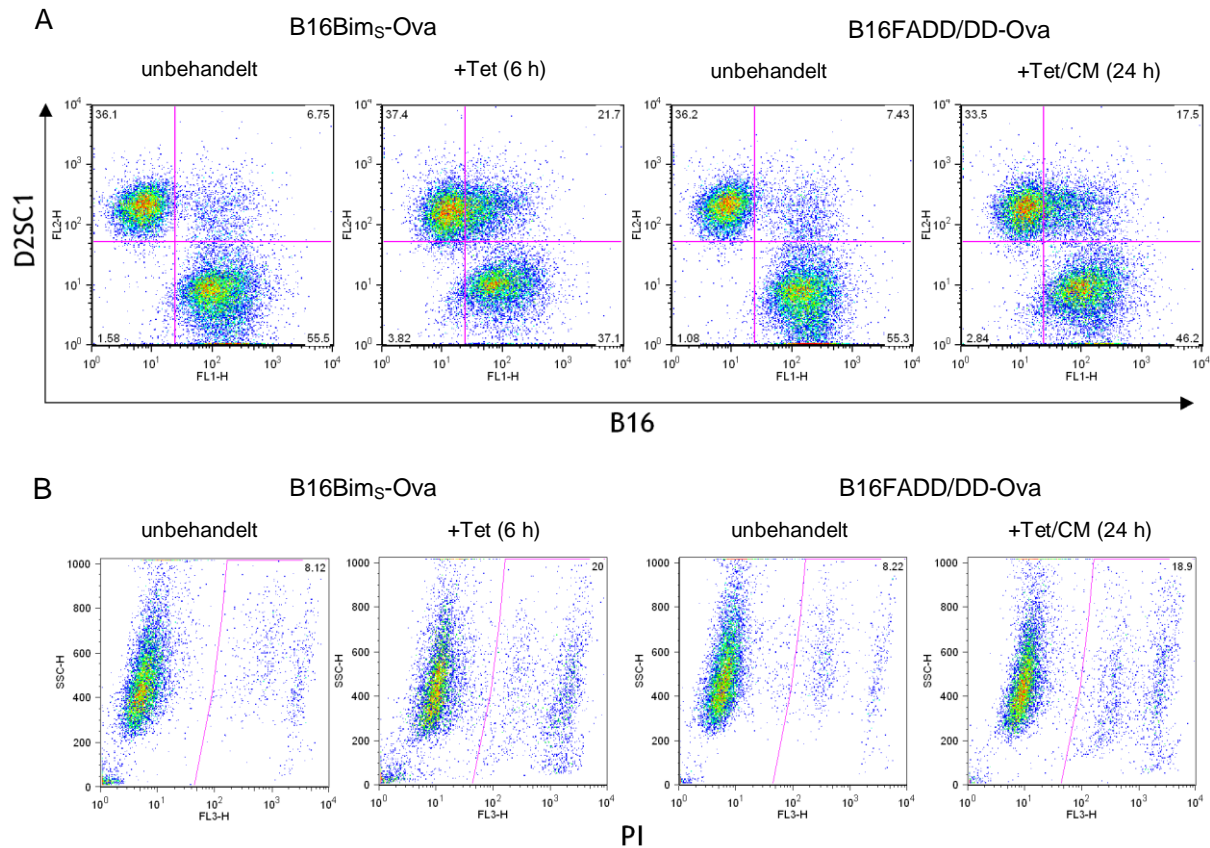


Abb.24: Aufnahme von Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen durch die Zelllinie D2SC1. B16-Zellen wurden mit PKH67 grün gefärbt und für 6 h bzw. 24 h mit Tetracyclin bzw. mit Tetracyclin und Coumermycin induziert. D2SC1-Zellen wurden mit PKH rot gefärbt und mit den B16-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 für 24 h inkubiert. A zeigt FACS-Analyse des Phagozytoseexperimentes und B die Lebend-Tod-Diskriminierung der B16-Zellen mit Hilfe der Propidiumjodid (PI)-Färbung.

3.2.3 Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen durch BMDCs

Nun wurde die Aufnahme von toten Zellen durch primäre dendritische Zellen getestet. Dafür wurden primäre dendritische Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs) von C57BL/6-Mäusen durch Zugabe von dem Wachstumsfaktor GM-CSF ausdifferenziert. B16Bim_S-Ova- bzw. B16FADD/DD-Ova-Zellen wurden grün angefärbt. Bim_S und FADD/DD wurde jeweils für 6 h und für 24 h mit Tet bzw. mit Tet/CM induziert. Die dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurden mit den vorher für 6 h bzw. 24 h induzierten B16-Zelllinien in einem Verhältnis von 1:1 für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die BMDCs rot gefärbt und das Gemisch wurde im FACS analysiert.

Abbildung 25 zeigt die FACS-Analyse der Cokultivierung von unbehandelten und von induzierten (jeweils 6 h und 24 h) B16Bim_S-Ova- bzw. B16FADD/DD-Ova-Zellen mit BMDCs.

Dargestellt sind jeweils eine Population der BMDCs (y-Achse) und eine Population der B16-Zelllinien (x-Achse). Die doppeltpositive Population steht für die Aufnahme von Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen durch BMDCs. Nach 6 h und nach 24 h Bim_S- bzw. FADD/DD-Induktion wurden sowohl apoptotische als auch nekrotische B16-Zellen etwa zu gleichen Teilen von BMDCs phagozytiert. In der Abbildung 25 ist zusätzlich die Lebend-Tod-Diskriminierung von unbehandelten und induzierten B16-Zellen durch die Propidiumjodid-Aufnahme dargestellt. Dies stellt eine Mischung aus intakten und nicht intakten Zellen dar. In welchem Zustand die Zellen aufgenommen wurden und ob Zellfragmente oder ganze Zellen phagozytiert wurden, ist in diesem Versuch nicht dargestellt. Die Daten zeigen, dass sowohl apoptotische (Bim_S-induzierte) als auch nekrotische (FADD/DD-induzierte) B16-Ova-Zellen zu etwa gleichen Teilen von primären dendritischen Zellen phagozytiert wurden.

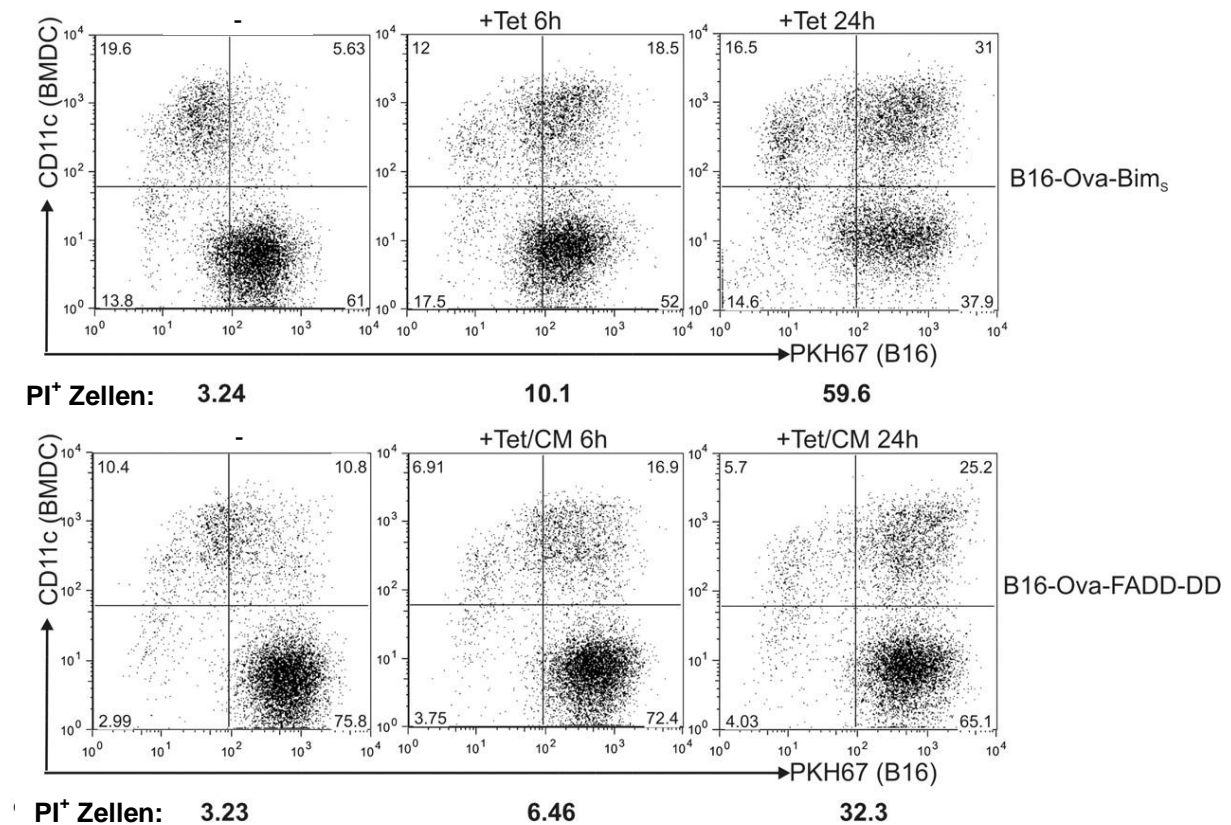


Abb.25: Phagozytose von unbehandelten und induzierten B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen durch BMDCs. Rot markierte BMDCs wurden in einem Verhältnis von 1:1 für 24 h bei 37°C mit jeweils unbehandelten, für 6 h und für 24 h mit Tetracyclin (Tet) bzw. Tetracyclin/Coumermycin (Tet/CM) behandelten grün markierten B16Bim_S- oder B16FADD/DD-Zellen kokultiviert. Unter den FACS-Analysen ist jeweils die Prozentzahl der Propidiumjodid-positiven (PI+) B16-Zellen angegeben.

3.2.4 Reifung von dendritischen Zellen durch Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen

Im nächsten Experiment wurde getestet, ob dendritische Zellen nach Phagozytose von apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen zur Reifung aktiviert und zur erhöhten Expression von costimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 stimuliert werden. Dazu wurde Bim_S bzw. FADD/DD in B16-Ova-Zellen für 6 h bzw. 24 h mit Tet bzw. Tet/CM induziert und in einem Verhältnis von 1:1 mit dendritischen Knochenmarkszellen (BMDCs) für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die BMDCs mit einem anti-CD11c-APC-Antikörper und entweder mit den Antikörpern anti-CD80-PE oder anti-CD86-PE gefärbt und im FACS analysiert. Als Positivkontrolle wurden die BMDCs mit dem TLR-Liganden poly (I:C) aktiviert. Dies konnte durch die Expression der Reifungsmarker CD40 und CD86 an der Oberfläche der BMDCs nachgewiesen werden. BMDCs, die nur in Medium inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle.

Abbildung 26 zeigt die Oberflächen-Analyse von BMDCs im Durchflusszytometer. Es konnte keine Aktivierung von BMDCs durch induzierte B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen festgestellt werden. Das heißt, es ist keine erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD40 im FACS nachzuweisen. Die Positivkontrolle, bei der dendritische Zellen durch poly (I:C) stimuliert wurden, wies eine Expression der Aktivierungsmarker CD86 und CD40 auf. Die Daten zeigen, dass weder phagozytierte apoptotische (Bim_S-induzierte) noch nekrotische (FADD/DD-induzierte) B16-Ova-Zellen eine Reifung von BMDCs und somit eine erhöhte Expression der costimulierenden Moleküle veranlassen.

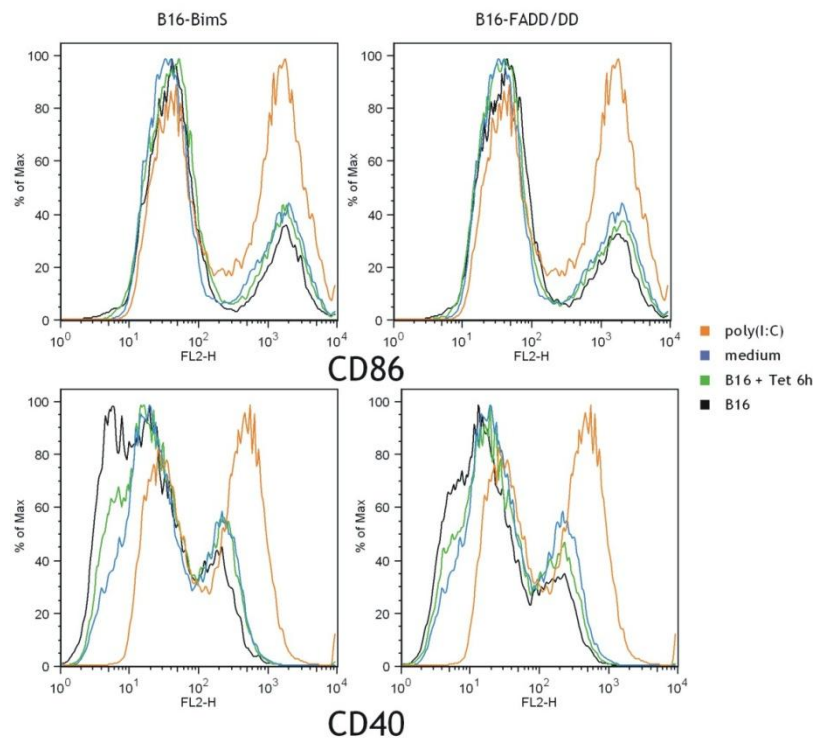


Abb.26: Oberflächenexpression der costimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 auf dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs), die für 24 h mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen inkubiert wurden. Die BMDCs wurden mit einem anti-CD11c-Antikörper und entweder mit einem anti-CD86- oder anti-CD40-Antikörper gefärbt und im FACS analysiert. Dabei wurde nur die CD11c⁺ Population herausgefiltert. Als positive Kontrolle wurden die BMDCs mit poly (I:C) inkubiert.

3.2.5 Kreuzpräsentation von Antigenen aus apoptotischen oder nekrotischen B16-Ova-Zellen für CD8⁺ T-Zellen durch BMDCs

Die Aufnahme von toten Zellen durch dendritische Zellen kann eine Proliferation von CD8⁺ T-Zellen veranlassen. Um dies zu testen, wurde ein Versuch gestartet, bei dem reife BMDCs (dendritische Zellen aus dem Knochenmark) mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen und CD8⁺ T-Zellen für drei Tage inkubiert wurden. Die CD8⁺ T-Zellen stammen von einer OT-1 Maus und exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für das Ovalbuminpeptid SIINFEKL ist. Die T-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) markiert, der sich intrazellulär in die Membran setzt. Diese Färbung kann für die Analyse von proliferierenden Zellen genutzt werden. Die Intensität des Farbstoffs nimmt durch die Teilung der Zellen ab. Interleukin-2 wurde ebenfalls hinzu gegeben, um das T-Zell-Wachstum zu unterstützen (T-Zellzyklus-Progression) (Cantrell und Smith, 1984).

In Abbildung 27 ist eine deutliche T-Zell-Proliferation zu erkennen, sowohl wenn BimS-induzierte als auch wenn FADD/DD-induzierte B16-Ova-Zellen mit BMDCs und OT-1 T-

Zellen inkubiert wurden. Das Histogramm zeigt die FACS-Analyse von CFSE-markierten OT-1 T-Zellen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen und BMDCs für 72 h inkubiert wurden. Dargestellt ist die Intensität der CFSE-Fluoreszenz von CD8⁺ T-Zellen. Die Verschiebung der Fluoreszenz zeigt die Verdünnung des Farbstoffs CFSE infolge von Zellteilung. Die weiße Kurve zeigt die erhöhte Proliferation der OT-1 T-Zellen, die mit apoptotischen B16Bim_S- bzw. nekrotischen B16FADD/DD-Ova-Zellen und mit BMDCs inkubiert wurden. Die graue Kurve zeigt die Negativkontrolle, in der unbehandelte B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen mit BMDCs und OT-1 T-Zellen inkubiert wurden.

Abbildung 27 zeigt, dass die dendritischen Zellen (BMDCs) nicht nur Antigen von toten B16-Zellen aufnehmen, sondern dieses auch für T-Zellen präsentieren. Das Tumorzell-assoziierte Antigen Ovalbumin aus apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen kann also für OT-1 T-Zellen über dendritische Zellen kreuzpräsentiert werden. Daraus folgt eine Proliferation von CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen, die durch die Abnahme der Intensität des CFSE-Farbstoffs erkennbar ist. Bemerkenswert ist, dass sowohl die Aufnahme von apoptotischen als auch von nekrotischen B16-Zellen eine annähernd gleiche Proliferation von T-Zellen verursachte. Sowohl die Abwesenheit von dendritischen Zellen (Daten nicht gezeigt), als auch die Inkubation mit lebenden B16-Zellen zeigten keine Proliferation von CD8⁺ T-Zellen.

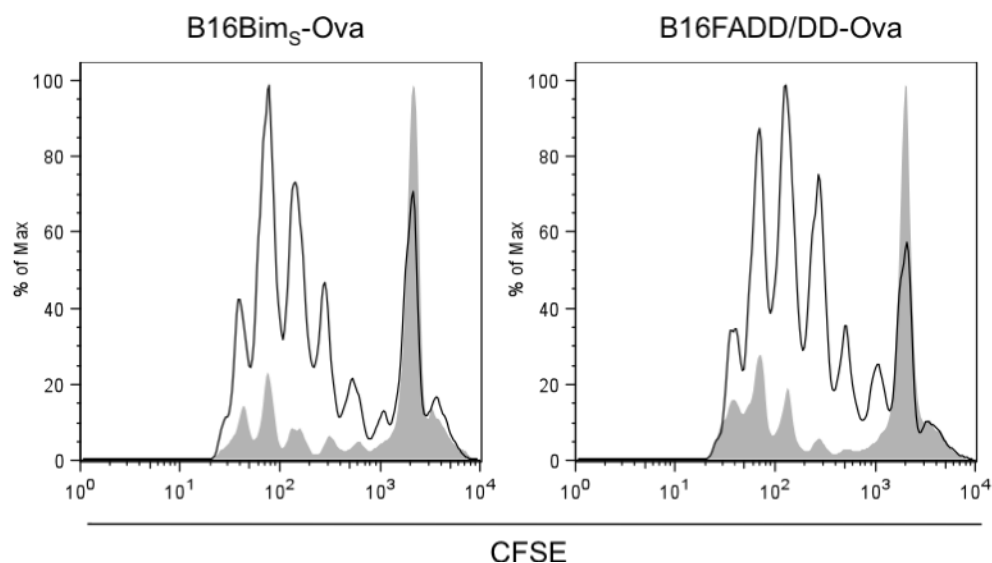


Abb.27: Kreuzpräsentation von B16-Tumorzell-assoziiertem Antigen Ovalbumin durch BMDCs *in vitro*. Das Histogramm zeigt die FACS-Analyse von CFSE-markierten OT1-T-Zellen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Ova-Zellen und BMDCs für 72 h inkubiert wurden. Das Histogramm zeigt die Intensität der CFSE-Fluoreszenz von CD8⁺ T-Zellen. In weiß ist die Proliferation der OT-1 T-Zellen dargestellt und in grau die negative Kontrolle. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.2.6 Freisetzung von HMGB1 als immunstimulierendes Signal

HMGB1 zählt zu den Proteinen der *high-mobility group box*, die an die DNA binden und die Transkription und andere nukleare Funktionen beeinflussen können. (Bustin, 2010). HMGB1 ist ein prototypisches Molekül der DAMP-Gruppe (*damage associated molecular pattern molecule*). Um als Warnsignal und inflammatorischer Mediator zu wirken, muss HMGB1 in den extrazellulären Raum transportiert werden. HMGB1 kann aktiv von inflammatorischen Zellen oder passiv als lösliche Moleküle aus nekrotischen Zellen ausgeschüttet werden (Tesniere et al., 2008 und Tang et al., 2010). Die Freisetzung von HMGB1 kann also eine Immunantwort gegen nekrotisch sterbende Tumorzellen hervorrufen. Freigesetztes HMGB1 bindet über den Toll-*like*-Rezeptor 4 an dendritische Zellen und kann über die Präsentation von Tumorantigenen die Immunantwort kontrollieren (Apetoh et al., 2007). Die Frage, ob HMGB1 auch während des apoptotischen Zelltodes ausgeschüttet wird, ist viel diskutiert. Zunächst war bekannt, dass nur durch Nekrose HMGB1 freigesetzt wird und nicht durch apoptotische Zellen. Doch einige Untersuchungen haben gezeigt, dass während des apoptotischen Zelltodes nukleare DNA freigesetzt und die Bindung von HMGB1 an die DNA erhöht wird. Sowohl Bell et al. (2006) als auch Tian et al. (2007) konnten zeigen, dass HMGB1 von apoptotischen Tumorzellen freigesetzt wird und dass dies durch den pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk blockiert werden konnte.

In Abbildung 28 ist das Auftreten von HMGB1 im Überstand von Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Zellen im Westernblot dargestellt. Die Abbildung zeigt B16-Zelllysate von induzierten und unbehandelten B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Zellen, die mit dem anti-HMGB1-Antikörper beprobt wurden. In Abbildung 28 oben ist der Überstand von B16-Zellen aufgetragen, in dem HMGB1 sowohl aus FADD/DD-induzierten nekrotischen als auch aus Bim_S-induzierten apoptotischen B16-Zellen bei einer Proteingröße von 30 kDa nachgewiesen werden konnte. Unbehandelte B16-Zellen lassen im Überstand kein HMGB1 nachweisen. Dies ist das erste Experiment und muss noch wiederholt werden. Es gibt einen ersten Hinweis, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische B16-Zellen HMGB1 freisetzen.

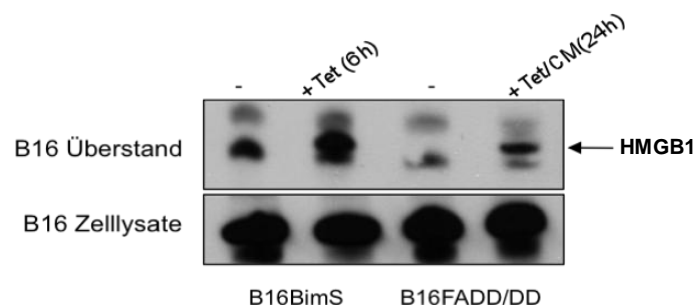


Abb.28: Ausschüttung von HMGB1 nach Zelltodinduktion durch Bim_S (6 h) und FADD/DD (24 h). Westernblotanalyse von Lysaten aus B16Bim_S- und B16FADD/DD-Zellen und -Überstand. Bim_S und FADD/DD wurde in B16-Zellen mit Tetracyclin für 6 h bzw. mit Tetracyclin und Coumermycin (24 h) induziert. Der anti-HMGB1-Antikörper erkennt eine Bande auf der Höhe von 30 kDa, was der Proteingröße von HMGB1 entspricht.

3.3 Einfluss apoptotischer oder nekrotischer B16-Tumorzellen auf das Immunsystem im Mausmodell

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Apoptose und Nekrose von Tumorzellen *in vivo* zu induzieren und die Bedeutung dieser Zelltode für die Immunabwehr zu untersuchen. Apoptose wurde über Bim_S und Nekrose über FADD/DD in B16-Tumorzellen im Mausmodell durch Injektion von Doxycyclin ausgelöst. Ein Nachweis für Bim_S- bzw. FADD/DD-Induktion *in vivo* konnte aufgrund von technischen Problemen nicht erbracht werden.

Folgendes Mausmodell wurde erstellt. Zuerst wurde ein B16-Tumor gesetzt, indem 2×10^5 B16Bim_S- oder 5×10^5 B16FADD/DD-Ova-Zellen subkutan in die rechte Flanke einer C57BL/6-Maus injiziert wurden. Die erhöhte Anzahl von B16FADD/DD-Ova-Zellen ergab sich daraus, dass die Zellen schlechter angewachsen waren als B16Bim_S-Ova-Zellen. Nach etwa 1-2 Wochen wuchs der Tumor auf einen Durchmesser von ca. 5 mm² heran. Nun wurde durch zweimalige Injektion von 200 µg Doxycyclin (Dox) pro Maus in die Bauchhöhle (intraperitoneal, *i.p.*) Bim_S bzw. FADD/DD in den Tumoren induziert. Abbildung 29 zeigt die Skizze des Mausmodells.

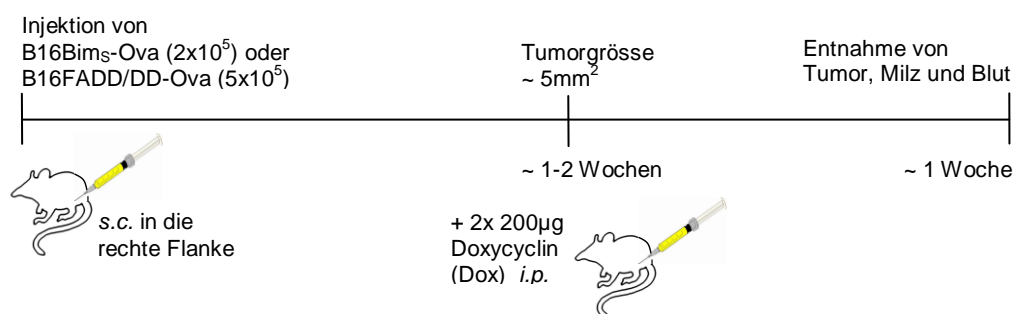


Abb.29: Skizze des *in vivo* Mausmodells, in dem B16-Tumoren subkutan gesetzt wurden. Nachdem der Tumor eine Größe von 5 mm² erreichte, wurde Bim_S bzw. FADD/DD durch Injektion von 2x 200 µg Doxycyclin *i.p.* in die rechte Flanke der Mäuse induziert. Nach 1 Woche wurde die immunologische Analyse aus Blut und Milz gemacht. Das Tumorstadium wurde über den gesamten Zeitraum vermessen.

Erste Experimente ergaben keine messbare Immunantwort. Nach Tetramerfärbung konnten keine SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut nachgewiesen werden. Auch eine intrazelluläre Zytokinfärbung für Interferon-γ (IFN-γ) von *in vitro* restimulierten Splenozyten zeigte keine IFN-γ-Produktion in CD8⁺ T-Zellen.

3.3.1 Tumorwachstum von B16Bim_S- und von B16FADD/DD-Tumoren *in vivo*

3.3.1.1 B16Bim_S-Tumore

Injektion von B16Bim_S-Tumorzellen und gleichzeitige Apoptose-Induktion *in vivo*

In einem der ersten Experimente *in vivo* wurden 2×10^5 B16Bim_S-Zellen subkutan in die Flanken von acht C57BL/6-Mäusen injiziert. Gleichzeitig wurden bei vier Mäusen 200 µg Doxycyclin intraperitoneal gespritzt, um Bim_S in den Tumorzellen zu induzieren. Vier Mäuse blieben unbehandelt und dienen als Kontrolle. Die Tumore wurden über einen Zeitraum von 26 Tagen vermessen.

Abbildung 30 zeigt den Verlauf des B16Bim_S-Tumorwachstums über einen Zeitraum von 26 Tagen. Ohne Behandlung entwickelten sich in 3 von 4 Mäusen Tumoren (blaue Linien). Die Induktion von Bim_S durch Doxycyclin-Injektion führte dagegen nur bei 1 von 4 Mäusen zur Etablierung eines Tumors (rote Linien). Daraus kann man schließen, dass die durch Doxycyclin induzierte Apoptose in den Tumorzellen die Tumorbildung unterdrückt hat.

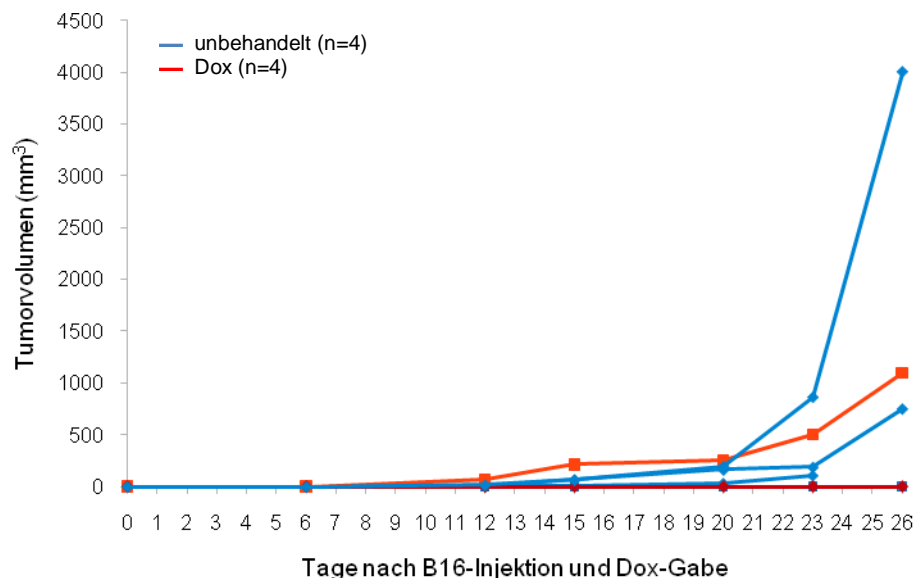


Abb.30: B16Bim_S-Tumorwachstum nach gleichzeitiger Apoptose-Induktion durch Doxycyclin-Gabe. Es wurden 2×10^5 B16Bim_S-Zellen subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt ist das Volumen von Tumoren aus 8 Mäusen, von denen 4 unbehandelt blieben (blau) und bei 4 Mäusen Bim_S durch Doxycyclin-Gabe (rot) induziert wurde. Das Tumorwachstum wurde über einen Zeitraum von 26 Tagen vermessen.

Dieser Versuch wurde nur mit B16Bim_S-Zellen durchgeführt, da zunächst Schwierigkeiten bei der Etablierung von B16FADD/DD-Tumoren auftraten. Die Anzahl an injizierten B16FADD/DD-Zellen musste neu austitriert werden.

Apoptose-Induktion in etablierten B16Bim_S-Tumoren *in vivo*

In den folgenden Experimenten wurden 2×10^5 B16Bim_S-Tumorzellen subkutan in die Flanken von 19 C57BL/6-Mäusen injiziert. Als der Tumor einen Durchmesser von ca. 5 mm² erreichte, wurde Apoptose durch Injektion von Doxycyclin in den Tumoren ausgelöst. Abbildung 31 zeigt das Wachstum von B16Bim_S-Tumoren. Durch Induktion von Bim_S in etablierten B16Bim_S-Tumoren durch Injektion von Doxycyclin konnte das Tumorstadium nicht verhindert werden.

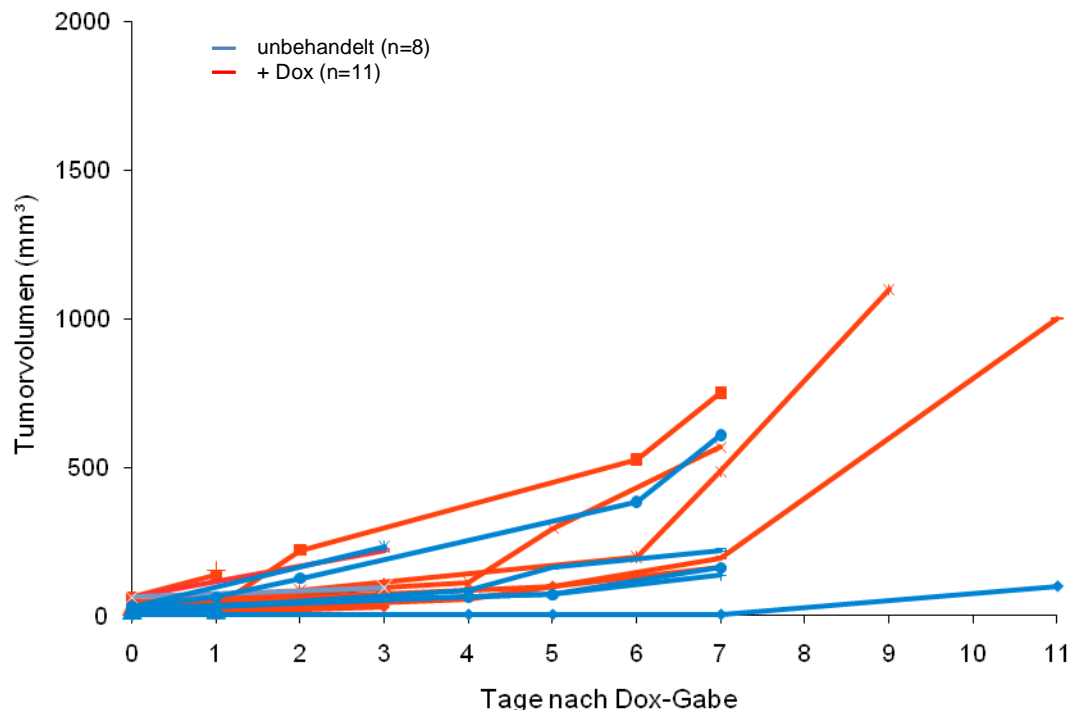


Abb.31: Tumorstadium von B16Bim_S-Tumoren nach Apoptose-Induktion durch Doxycyclin-Gabe. Es wurden 2×10^5 B16Bim_S-Zellen subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt ist das Volumen von Tumoren aus 19 Mäusen ab dem Zeitpunkt der Bim_S-Induktion (Dox-Gabe), von denen 8 unbehandelt blieben (blau) und bei 11 Mäusen (rot) Bim_S durch Doxycyclin-Gabe induziert wurde. Die Tumorstadien wurden über einen Zeitraum von 0 bis 7 bzw. 11 Tagen vermessen.

3.3.1.2 B16FADD/DD-Tumore

Nekrose-Induktion in etablierten B16FADD/DD-Tumoren *in vivo*

Abbildung 32 zeigt das Wachstum von B16FADD/DD-Tumoren. Auch in etablierten B16FADD/DD-Tumoren konnte das Tumorstadium nicht verhindert werden, wenn durch Injektion von Doxycyclin FADD/DD in den Tumoren induziert wurde.

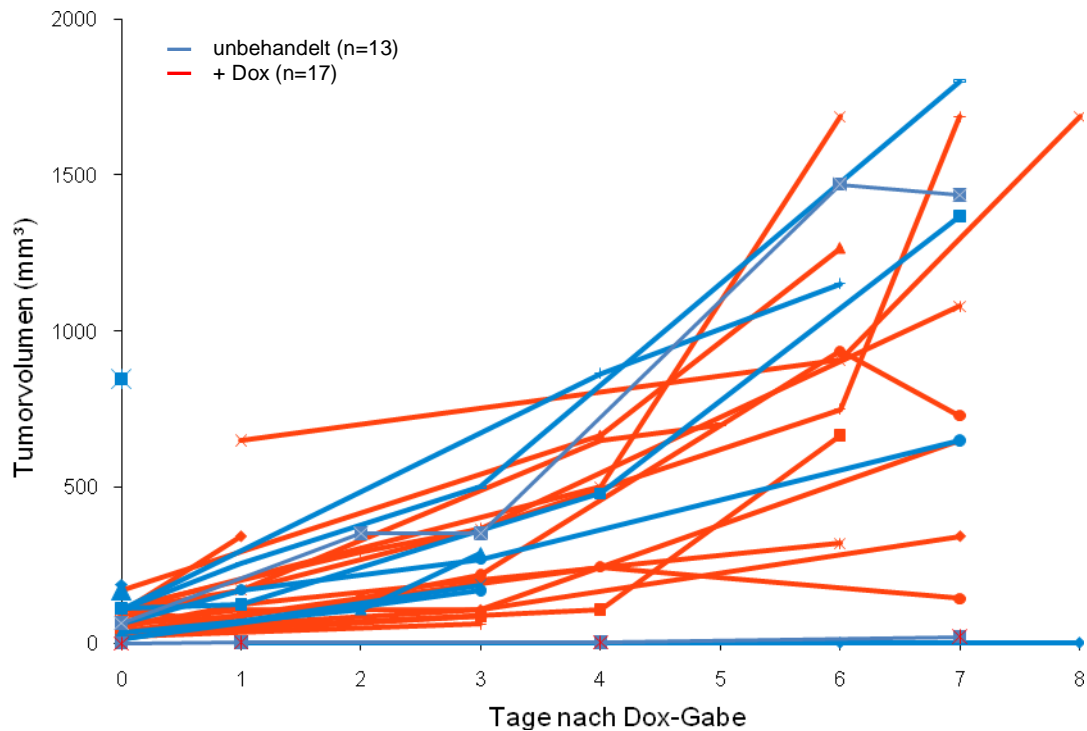


Abb.32: Tumorstadium von B16FADD/DD-Tumoren nach Nekrose-Induktion durch Doxycyclin-Gabe. Es wurden 5×10^5 B16FADD/DD-Zellen subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt ist das Volumen von Tumoren aus 30 Mäusen, von denen 13 unbehandelt blieben (blau) und bei 17 Mäusen (rot) FADD/DD im Tumor durch Doxycyclin-Gabe induziert wurde. Die Tumorstadien wurden über einen Zeitraum von 0 bis 7 bzw. 8 Tagen vermessen.

3.3.2 Vakzinierungsmodell

In einer Vakzinierung wird exogenes Antigen (Ag) für antigenpräsentierende Zellen bereitgestellt. Gleichzeitig werden antigenpräsentierende Zellen durch ein Adjuvans aktiviert. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen sind in der Lage, Antigene für T-Effektorzellen zu kreuzpräsentieren und B-Zellen zu aktivieren. Heit et al. (2008) haben ein Vakzinierungsprotokoll entwickelt, in dem sie ein Adjuvans und ein Antigen in biologisch abbaubaren Mikrosphären verpackt haben. Dies haben wir uns zunutze gemacht und konnten Mäuse, die einen B16Bim_S-Ova bzw. B16FADD/DD-Ova Tumor trugen, mit Mikrosphären vakzinieren, die das Antigen Ovalbumin gekoppelt mit dem adjuvanten TLR9-Liganden CpG-ODN 1826 enthielten.

Abbildung 33 zeigt ein Mausmodell, das für die weiteren Versuche angewandt wurde. Zuerst wurden 2×10^5 B16Bim_S- oder 5×10^5 B16FADD/DD-Ova-Zellen subkutan in die rechte Flanke einer C57BL/6-Maus injiziert. Nachdem die Tumoren auf eine Größe von etwa 5 mm^2 herangewachsen waren, wurde durch zweimalige Injektion von $200 \mu\text{g}$ Doxycyclin intraperitoneal Bim_S bzw. FADD/DD in den Tumoren induziert. 7 Tage nach Induktion von Bim_S bzw. FADD/DD wurden 5 mg Ovalbumin-CpG-haltige Mikrosphären (MP) subkutan (s.c.) in die linke Flanke von C57BL/6-Mäusen injiziert. Nach 6 Tagen wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen. Nach weiteren 2 Tagen ein zweites Mal Blut entnommen und die Mäuse wurden anschließend getötet. Die Milz und der Tumor wurden entnommen und zur weiteren Analyse aufbereitet. Während des Experiments wurde das Tumorwachstum verfolgt, indem der Tumor in seiner Längs- und Querachse vermessen wurde. Immunologische Analysen wie Tetramerkfärbung der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut und der Milz und eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN- γ von *in vitro* restimulierten Splenozyten folgten.

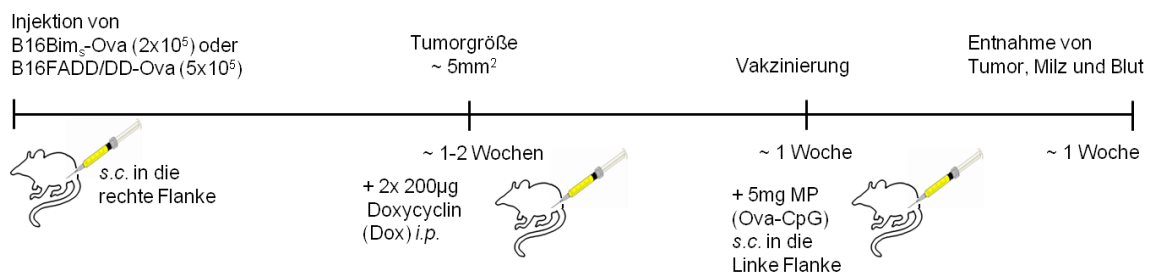


Abb.33: Skizze des *in vivo* Mausmodells, in dem B16-Tumoren subkutan gesetzt wurden. Nachdem der Tumor angewachsen ist und Zelltod durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde, wurden die Mäuse mit Ovalbumin-CpG-haltigen Mikrosphären vakzinert, bevor die Mäuse immunologisch analysiert wurden.

3.3.3 B16-Tumorwachstum in Mäusen mit Vakzinierung

3.3.3.1 B16Bim_S-Tumore mit Vakzinierung

In Abbildung 34 ist das Tumorwachstum von B16Bim_S-Tumoren dargestellt. Auch in vakzinieren Mäusen konnte durch Induktion von Bim_S in etablierten B16Bim_S-Tumoren durch Injektion von Doxycyclin das Tumorwachstum nicht verhindert werden.

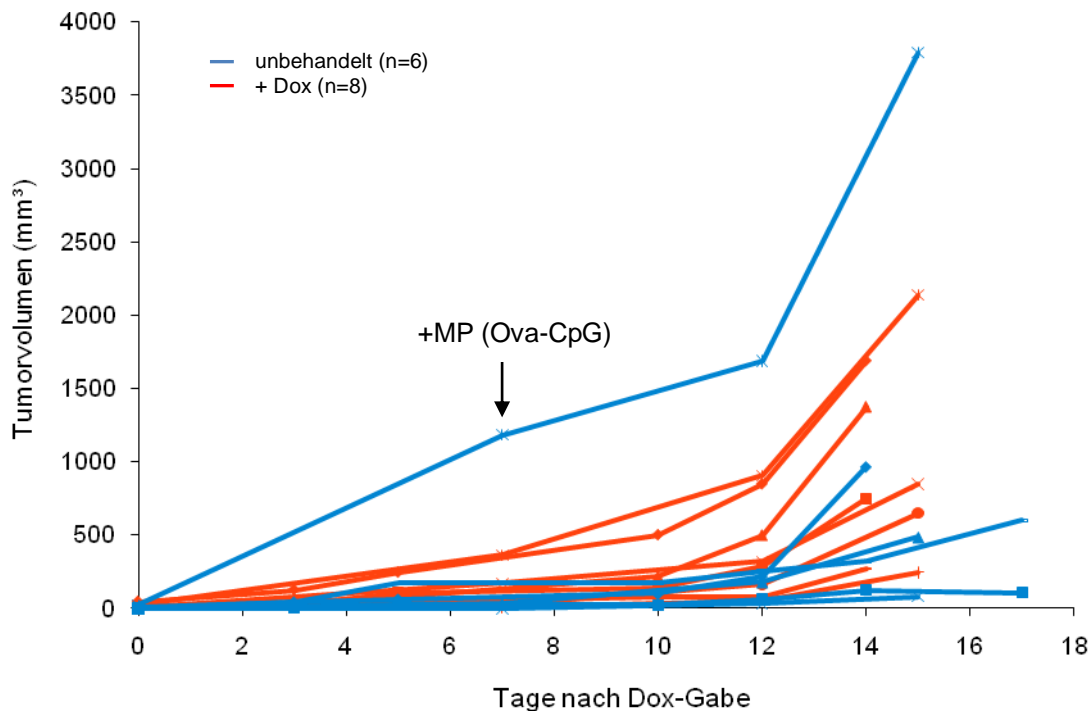


Abb.34: Tumorwachstum von B16Bim_S-Tumoren nach Apoptose-Induktion in vakzinieren Mäusen. Es wurden 2×10^5 B16Bim_S-Zellen subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt ist das Volumen von Tumoren aus 14 Mäusen, von denen 6 unbehandelt blieben (blau) und bei 8 Mäusen (rot) Bim_S durch Doxycyclin-Gabe induziert wurde. 7 Tage nach Dox-Gabe wurden die Mäuse mit Ova-CpG haltigen Mikrosphären (MP) vakzinieren. Die Tumorvolumina wurden über einen Zeitraum von 0 bis 14, 15 bzw. 17 Tagen vermessen.

3.3.3.2 B16FADD/DD-Tumore mit Vakzinierung

Abbildung 35 zeigt das Tumorwachstum von B16FADD/DD-Tumoren. Durch Induktion von FADD/DD nach Injektion von Doxycyclin konnte auch in vakzinieren Mäusen das Tumorwachstum nicht verhindert werden.

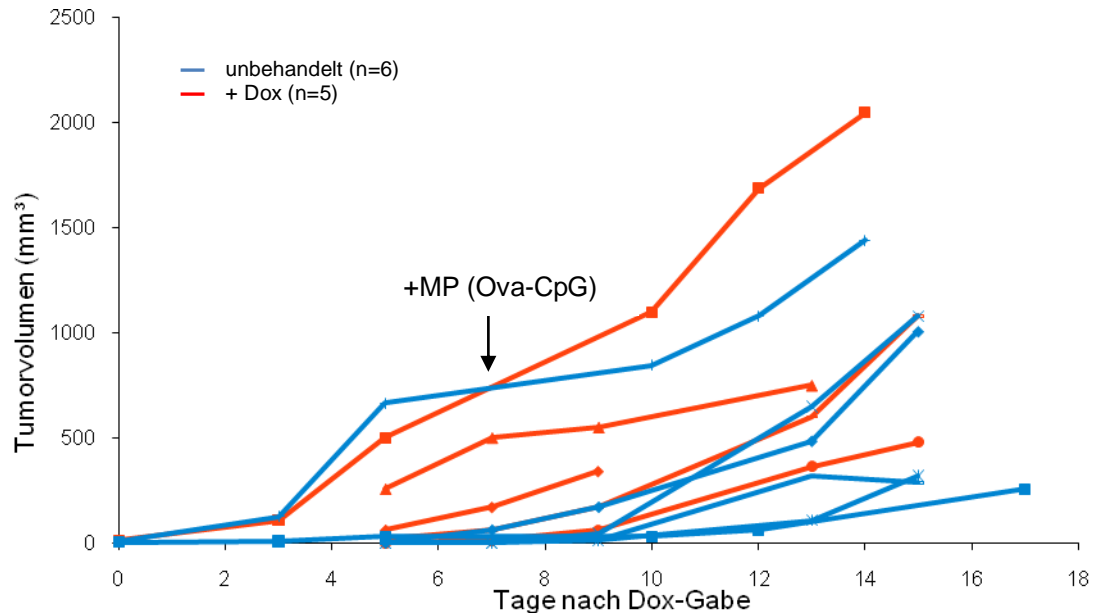


Abb.35: Tumorwachstum von B16FADD/DD-Tumoren nach Nekrose-Induktion in vakzinierten Mäusen. Es wurden 5×10^5 B16FADD/DD-Zellen subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt ist das Volumen von Tumoren aus 11 Mäusen, von denen 6 unbehandelt blieben (blau) und bei 5 Mäusen (rot) FADD/DD durch Doxycyclin-Gabe induziert wurde. 7 Tage nach Dox-Gabe wurden die Mäuse mit Ova-CpG haltigen Mikrosphären (MP) vakziniert. Die Tumorumfänge wurden über einen Zeitraum von 0 bis 13, 14, 15 bzw. 17 Tagen vermessen.

3.3.4 Histologische Analyse von B16Bim_S- und B16FADD/DD-Tumoren

Um die histologischen Veränderungen in B16-Melanomen zu analysieren, wurden Paraffinschnitte hergestellt, die mit Hämalaun und Eosin (H&E) angefärbt wurden. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen wie zum Beispiel Zellkerne blau und Eosin alle acidophilen wie zum Beispiel Zellplasmae rote.

Unter dem Lichtmikroskop konnte man die einzelnen B16-Tumorzellen erkennen und auch die Pigmentierung (Melanin) war deutlich zu sehen. Zahlreiche Blutgefäße durchzogen das Gewebe. Neben normalem Tumorgewebe zeigten sich auch große Areale an toten Zellen. Es ist typisch für Tumore, dass ganze Zellverbände absterben, da der Tumor eine ineffiziente Vaskularisierung hat (Gerber et al. 2009). Um einen Überblick über den gesamten Tumor zu bekommen, wurden verschiedene Bereiche im Tumor unter dem Lichtmikroskop fotografiert und ausgewertet.

Abbildung 36 zeigt einen Ausschnitt aus einem Bim_S-induzierten (B) und einem unbehandelten (A) Tumor. Der Tumor, in dem Apoptose durch Bim_S-Induktion ausgelöst wurde (B), wies eine große Fläche an totem Tumorgewebe (helle/rosa Fläche, siehe Beispiel in Markierung) auf. Der unbehandelte B16Bim_S-Tumor (A) zeigte neben intaktem Tumorgewebe (lila Fläche, siehe Beispiel in Markierung) auch einige Bereiche an totem

Tumorgewebe (helle/rosa Fläche). Die Pfeile zeigen die Pigmentierung (Melanin), die in beiden Tumoren vorhanden ist.

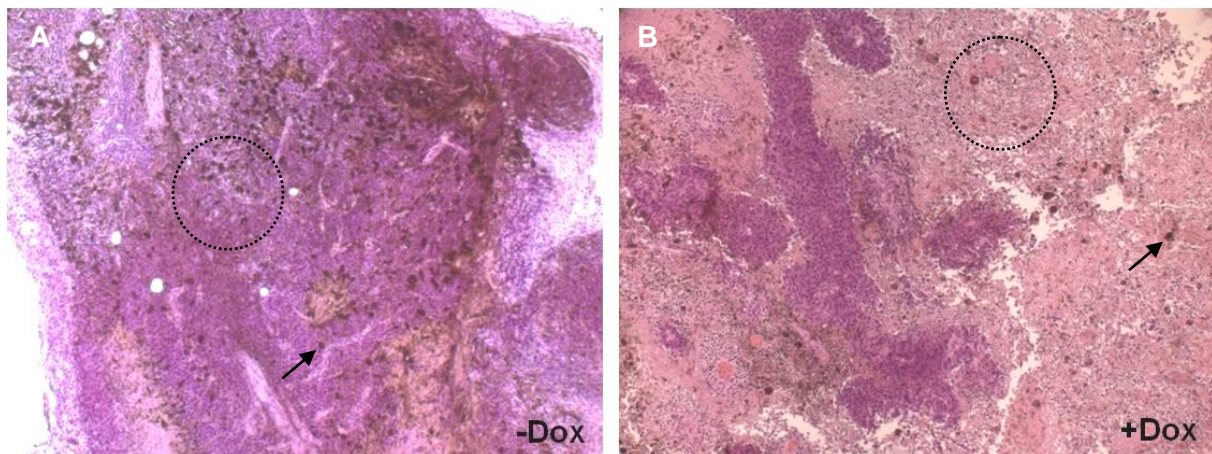


Abb.36 Histologische Analyse von Bim_S-induzierten B16-Tumoren nach H&E-Färbung. A zeigt einen unbehandelten B16Bim_S-Tumor und in B ist ein B16Bim_S-Tumor dargestellt, in dem Bim_S durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde.

In Abbildung 37 ist ein Ausschnitt eines FADD/DD-induzierten (B) und eines unbehandelten (A) Tumors abgebildet. Abbildung 37 B zeigt einen FADD/DD-induzierten Tumor (+Dox), in dem nur noch sehr wenig intaktes Tumorgewebe zu sehen ist. Der helle/rosa Bereich in der Mitte zeigt totes Tumorgewebe (siehe Beispiel in Markierung). In Abbildung 37 A ist ein unbehandelter B16FADD/DD-Tumor dargestellt, dessen Gewebe größtenteils intakt ist (siehe Beispiel in Markierung) und nur wenig Stellen mit totem Tumorgewebe (helle/rosa Fläche) aufweist. Die Pfeile deuten auf die Pigmentierung (Melanin), die in beiden Tumoren zu sehen ist.

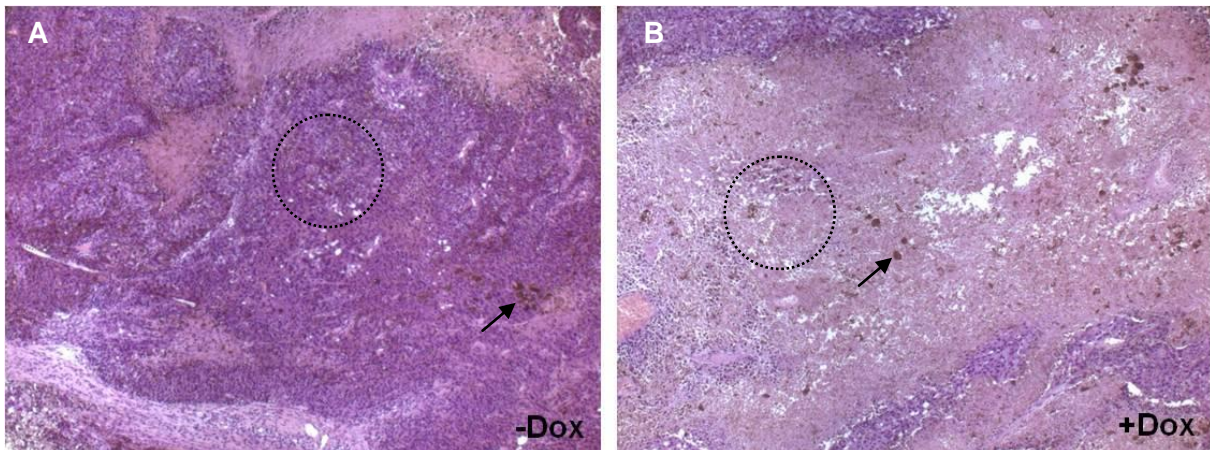


Abb.37: Histologische Analyse von B16FADD/DD-Tumoren nach H&E-Färbung. A zeigt einen Ausschnitt aus einem unbehandelten B16FADD/DD-Tumor. In B ist ein B16FADD/DD-Tumor dargestellt, in dem FADD/DD durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde.

Abbildung 38 zeigt ein Beispielbild, in dem man die apoptotischen B16-Tumorzellen deutlich von nicht-apoptotischen B16-Tumorzellen unterscheiden kann. Dies ist ein H&E-gefärbter Paraffinschnitt eines Bim_S-induzierten B16-Tumors. Der helle Bereich in der Mitte (siehe Markierung) zeigt totes Tumorgewebe, das von intakten B16-Tumorzellen umgeben ist. In diesem Bereich sind viele apoptotische B16-Tumorzellen zu erkennen. Sie zeigen typische fragmentierte Zellkerne (schwarze Pfeile). Im Vergleich dazu sieht man im intakten Tumorgewebe normale B16-Zellkerne (weißer Pfeil).

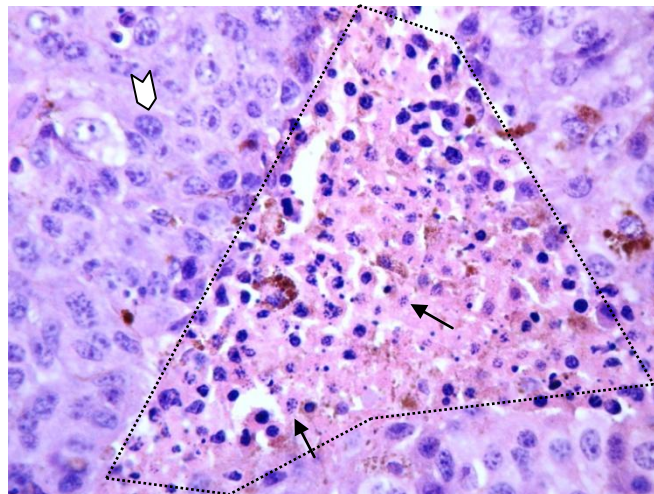


Abb.37: Mikroskopische Aufnahme eines Bim_S-induzierten apoptotischen B16-Tumors. Die Hämalaun- und Eosin-Färbung zeigt die Zellkerne (blau) und das Zellplasma (rot). Braun gefärbt stellt das Melanin dar, das natürlicherweise in B16-Zellen vorhanden ist. Der weiße Pfeil deutet auf einen normalen Kern einer B16-Tumorzelle hin. Die schwarzen Pfeile zeigen im toten Tumorgewebe auf fragmentierte Zellkerne, die ein typisches Zeichen für Apoptose darstellen.

In Abbildung 38 ist die Anzahl an Apoptosen in Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Tumoren (+Dox) im Vergleich zu unbehandelten B16-Tumoren dargestellt. Die apoptotischen Zellkerne (dargestellt in Abb. 37) wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurde ein Hauptgesichtsfeld (HPF) eingestellt, in dem alle apoptotischen Zellkerne gezählt wurden. Das Präparat wurde systematisch verschoben, bis 10 HPF ausgezählt wurden.

B16Bim_S-Tumoren, in denen Bim_S durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde, zeigen eine erhöhte Anzahl an Apoptosen im Vergleich zu unbehandelten B16Bim_S-Tumoren. Dagegen ist in FADD/DD-Tumoren kein Unterschied in der Apoptoseanzahl zwischen unbehandelten und FADD/DD-induzierten Tumoren festzustellen.

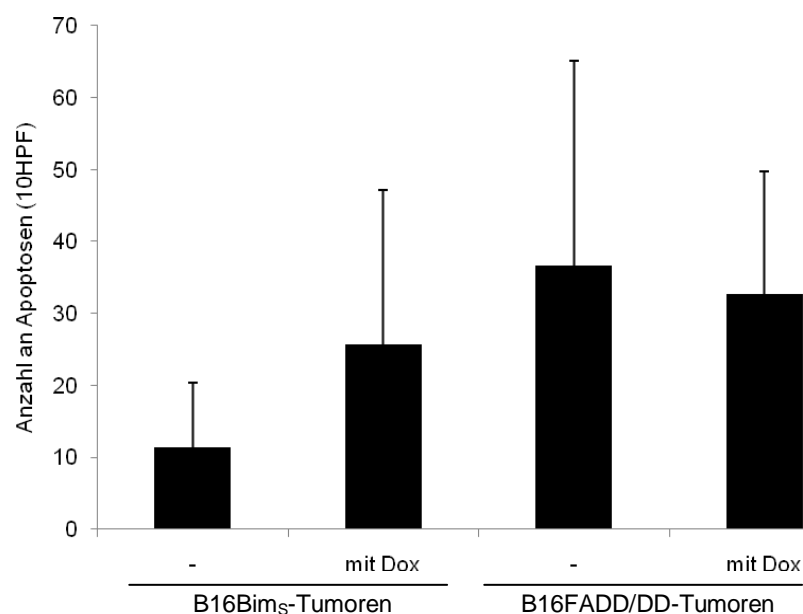


Abb.38: Auszählung der Apoptosen in 10 Hauptgesichtsfeldern (HPF) in Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten Tumoren im Vergleich zu unbehandelten Tumoren unter dem Durchlichtmikroskop. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 7 unbehandelten und 7 Bim_S-induzierten B16-Tumoren und 3 unbehandelten und 3 FADD/DD-induzierten B16-Tumoren.

Allgemein konnten Unterschiede auch in der Konsistenz der Tumoren festgestellt werden. Bim_S-induzierte Tumoren zeigten eine gummiartige Konsistenz. FADD/DD-induzierte Tumoren hatten eine gelartige bis ölige Konsistenz und zerflossen, sobald sie herauspräpariert wurden. Unbehandelte Tumoren waren fest und gut vom umliegenden Gewebe abgrenzbar.

3.3.5 Immunologische Analyse von Mäusen mit etabliertem B16-Tumor, in dem Apoptose *in vivo* induziert wurde

Wie in Abbildung 33 beschrieben, wurde ein Mausmodell angewandt, in dem subkutan B16Ova-Bim_S-Zellen gespritzt und bei einer Tumorgroße von etwa 5 mm² Bim_S durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde. Eine Woche später wurden die Mäuse mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären (s.c.) vakzinert. Nach weiteren 8 Tagen wurden das Blut und die Milz auf SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zellen analysiert und auf Interferon- γ -Produktion getestet. Dieser Versuch wurde nicht mit B16Ova-FADD/DD-Zellen durchgeführt, da zunächst Schwierigkeiten bei der Etablierung der Tumoren bestanden.

3.3.5.1 Analyse der CD8⁺ T-Zell-Antwort in Mäusen mit etabliertem B16Bim_S-Tumor

In Abbildung 39 ist die Analyse der CD8⁺ T-Zell-Antwort in Mäusen mit etabliertem B16Ova-Bim_S-Tumor dargestellt. Acht Tage nach Vakzinierung mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären wurde das Blut und die Milz auf SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zellen analysiert.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Anzahl an SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Blut zwischen Bim_S-induzierten und unbehandelten tumortragenden Mäusen festgestellt werden.

Nur 2 Mäuse, in deren Tumoren Bim_S induziert wurde (+Dox), wiesen sowohl in der Blut- als auch in der Milz-Analyse eine stark erhöhte Anzahl an SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf. 4 Mäuse aus dieser Gruppe zeigten in beiden Analysen hingegen nur eine geringe Anzahl an SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

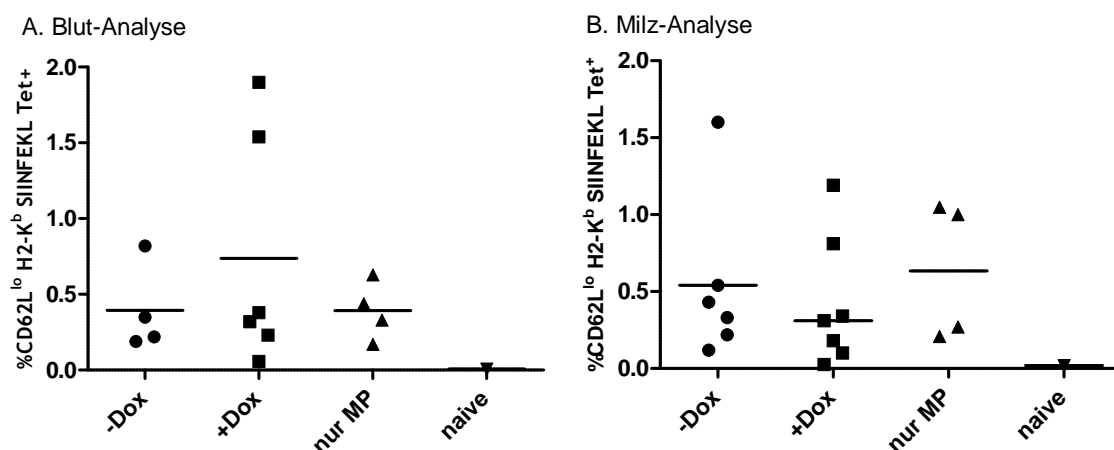


Abb.39: Tetrameranalyse der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut (A) oder in der Milz (B) von vakzinieren Mäusen mit subkutanem B16Bim_S-Tumor. Die Gruppen -Dox und +Dox sind tumortragende Mäuse und die Kontrollgruppen (nur MP und naive) sind Mäuse ohne Tumor.

Abbildung 40 zeigt die Analyse der Aktivität der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von vakzinierten Mäusen mit etabliertem B16Bim_S-Tumor. Die Analyse wurde mit Hilfe der intrazellulären Interferon-γ-Färbung durchgeführt. Auffallend ist, dass in Mäusen, die nur mit Mikrosphären (nur MP) behandelt wurden ein deutlicher Anstieg der INFγ⁺ T-Zellen zu messen ist im Gegensatz zu Mäusen, die einen etablierten B16Bim_S-Tumor tragen. Ein Unterschied zwischen unbehandelten und Bim_S-induzierten tumortragenden Mäusen, ist nicht festzustellen.

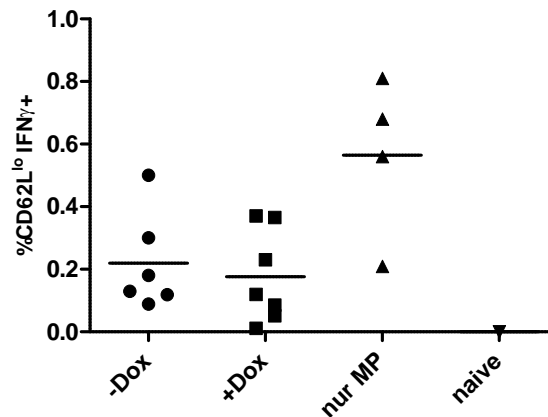


Abb.40: Prozentzahl von CD8⁺ CD62L^{lo} INFγ⁺ T-Zellen. Intrazelluläre Interferon-γ-Färbung von Splenozyten aus Mäusen mit etabliertem B16Ova-Bim_S-Tumor nach Vakzinierung mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären. Die Gruppen -Dox und +Dox sind tumortragende Mäuse und die Kontrollgruppen (nur MP und naive) trugen keinen Tumor.

3.3.6 Immunologische Analyse von Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden

In den folgenden Experimenten wurden apoptotische bzw. nekrotische B16-Zellen zur Immunisierung eingesetzt. Dazu wurden *in vitro* 1×10^6 B16Bim_S- bzw. B16FADD/DD-Ova-Zellen 6 h bzw. 24 h mit Tetracyclin bzw. Tetracyclin und Coumermycin induziert und anschließend in die rechte Flanke von je sechs C57BL/6 Mäusen injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären (MP) vakziniert. Nach weiteren 8 Tagen wurde eine T-Zell-Analyse aus den Milzen und dem Blut gemacht. In Abbildung 41 ist das Modell dargestellt.

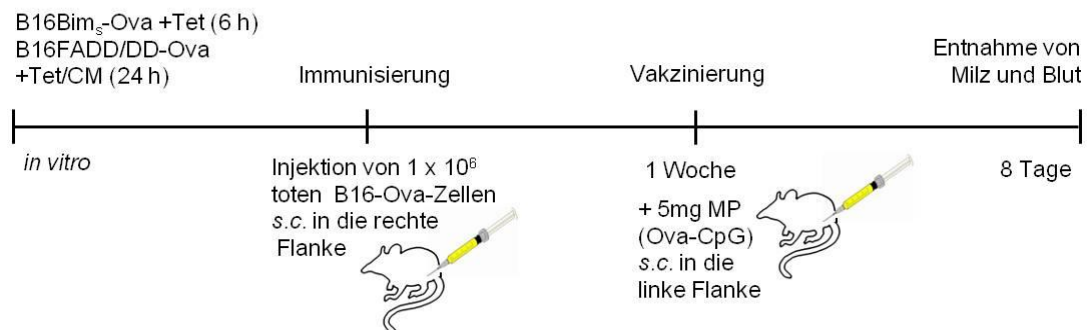


Abb.41: Skizze des *in vivo* Mausmodells, in dem mit toten B16Ova-Zellen immunisiert und anschließend mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurde. Anschließend wurde eine immunologische Analyse aus Blut und Milz durchgeführt.

3.3.6.1 Analyse der CD8⁺ T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen *in vivo*

Abbildung 42 zeigt die Blutanalyse auf CD8⁺ T-Zellen von Mäusen, die mit Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Die Tetrameranalyse ergab eine leichte Erhöhung der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut von Mäusen, die mit FADD/DD-induzierten nekrotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, im Gegensatz zu vakzinierten Mäusen ohne Immunisierung mit toten B16-Zellen. Mäuse, bei denen Bim_S-induzierte apoptotische B16Ova-Zellen gespritzt wurden, zeigten im Blut eine leichte Absenkung der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellzahl, im Gegensatz zu vakzinierten Mäusen ohne Immunisierung mit toten B16-Zellen. Der Unterschied zwischen Mäusen, die mit apoptotischen oder mit nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden, ist nach dem *Wilcoxon Two-Sample Test* statistisch signifikant ($p = 0.0314$). Auch der Unterschied zwischen Mäusen, die mit

nekrotischen (FADD/DD+Dox) B16Ova-Zellen immunisiert wurden und naiven Mäusen ($n = 3$), ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0486$). Doch der Unterschied zwischen Mäusen, die entweder mit apoptotischen ($p = 0.2919$) oder mit nekrotischen ($p = 0.1700$) B16-Zellen immunisiert wurden zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären (MP) behandelt wurden, ist nicht signifikant.

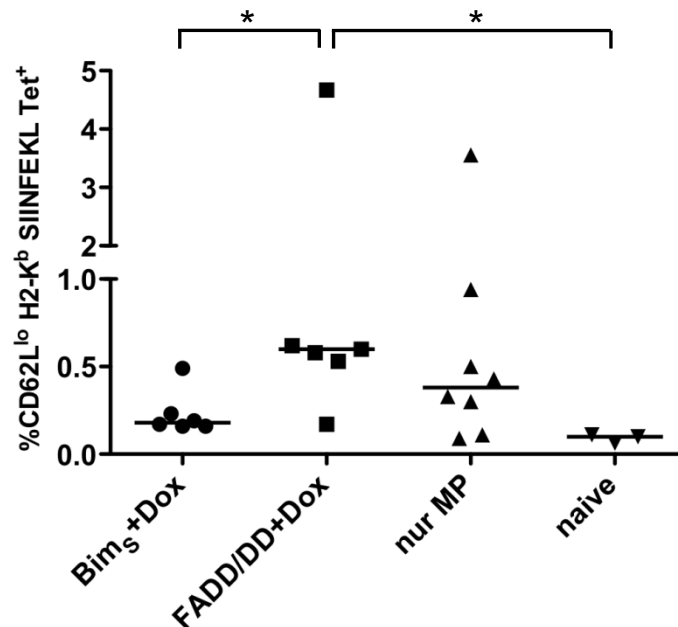


Abb.42: Tetrameranalyse der CD8⁺ T-Zellen im Blut von Mäusen, die mit Bim_S-induzierten ($n = 6$) bzw. FADD/DD-induzierten ($n = 6$) B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. 8 Mäuse, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden und 3 naive Mäuse dienten als Kontrolle und wurden nicht mit toten B16-Zellen immunisiert. Der Unterschied zwischen Mäusen, die mit apoptotischen (Bim_S+Dox) und Mäusen, die mit nekrotischen (FADD/DD+Dox) B16Ova-Zellen immunisiert wurden, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0314$). Auch der Unterschied zwischen Mäusen, die mit nekrotischen (FADD/DD+Dox) B16Ova-Zellen immunisiert wurden und naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0486$). (*, $p < 0.05$, Wilcoxon *Two-Sample* Test).

In Abbildung 43 ist die Milzanalyse auf CD8⁺ T-Zellen von Mäusen, die mit Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden, dargestellt. Die Milzen wurden ebenfalls auf SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe der Tetramerfärbung untersucht. Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie in der Blutanalyse. Mäuse, die mit apoptotischen Bim_S-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden, zeigten prozentual weniger CD8⁺ Splenozyten als Mäuse, die mit nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden. Zwei Mäuse, die mit nekrotischen B16-Ova-Zellen immunisiert wurden, zeigen sogar eine deutlich höhere Anzahl an CD8⁺ T-Zellen. Mäuse, bei denen apoptotische Tumorzellen injiziert wurden, zeigen im Median ähnlich viele CD8⁺ Splenozyten wie Mäuse, die nur mit Ova/CpG-haltigen

Mikrosphären vakziniert wurden. Mäuse, die mit nekrotischen Tumorzellen immunisiert wurden, weisen nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test einen signifikanten Unterschied zu naiven Mäusen auf ($p = 0.0491$).

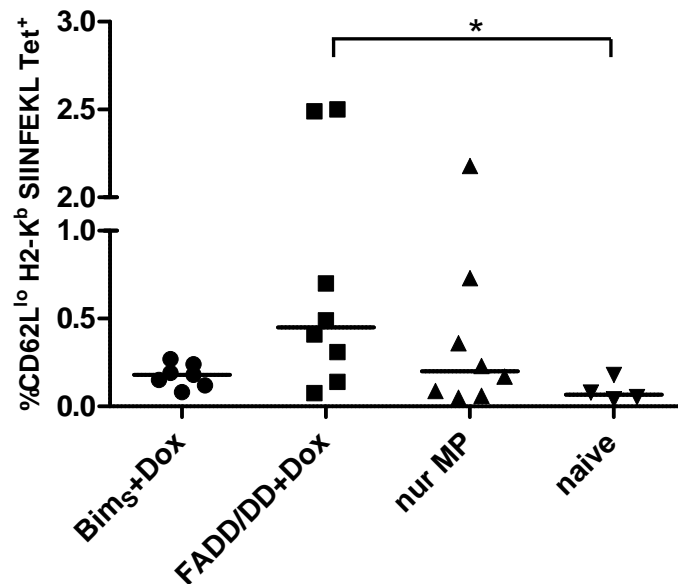


Abb.43: Tetrameranalyse der CD8⁺ T-Zellen aus den Milzen von 27 Mäusen, die mit Bim_S-induzierten ($n = 7$) bzw. FADD/DD-induzierten ($n = 8$) B16Ova-Zellen immunisiert und mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. 8 Mäuse, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden und 4 naive Mäuse dienten als Kontrolle und wurden nicht mit toten B16-Zellen immunisiert. Der Unterschied zwischen Mäusen, die mit nekrotischen (FADD/DD+Dox) B16Ova-Zellen immunisiert wurden und naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0491$). (*, $p < 0.05$, Wilcoxon *Two-Sample* Test).

Abbildung 44 zeigt die Analyse der Aktivität der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von Mäusen, die mit toten B16-Zellen immunisiert wurden. Dies wurde mit Hilfe der intrazellulären Interferon- γ -Färbung von CD8⁺ Splenozyten durchgeführt.

Bei Mäusen, die mit nekrotischen B16FADD/DD-Ova-Zellen immunisiert wurden, konnte ein Anstieg der Interferon- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit apoptotischen B16Bim_S-Ova-Zellen immunisiert wurden, weniger Interferon- γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen. Der Unterschied zwischen Mäusen, die mit nekrotischen B16Ova-Zellen (FADD/DD+Dox) immunisiert wurden, zu naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0408$). Auch der Unterschied zwischen Mäusen, die mit apoptotischen B16Ova-Zellen (Bim_S+Dox) immunisiert wurden, zu naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0486$). Doch der Unterschied von Mäusen, die entweder mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden, zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen

Phänomen wurde genutzt, um zu testen, ob in Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen Tumorzellen immunisiert wurden, ein zytotoxischer T-Zell-Effekt nachzuweisen ist.

Aus C57BL/6-Mäusen isolierte Milzzellen wurden zu 50 % mit einer hohen Konzentration an CFSE und dem Peptid SIINFEKL markiert. Die andere Hälfte der Milzzellen bekam eine niedrige CFSE-Konzentration und blieb ohne Peptid. Die Zellen wurden gemischt und anschließend *i.v.* in Mäuse gespritzt, die zwei Wochen vorher mit 1×10^6 apoptotischen B16Bim_S-Ova- bzw. 1×10^6 nekrotischen B16FADD/DD-Ova-Zellen immunisiert und mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Als Kontrolle wurden naive Mäuse und Mäuse, die nur Ova/CpG-haltige Mikrosphären bekommen haben, gleichermaßen behandelt. Nach 24 h wurden die Milzen der Mäuse entfernt und im FACS auf die Anteile an T-Zellen mit hohen (mit SIINFEKL-Peptid) und niedrigen (ohne Peptid) CFSE-Konzentrationen analysiert.

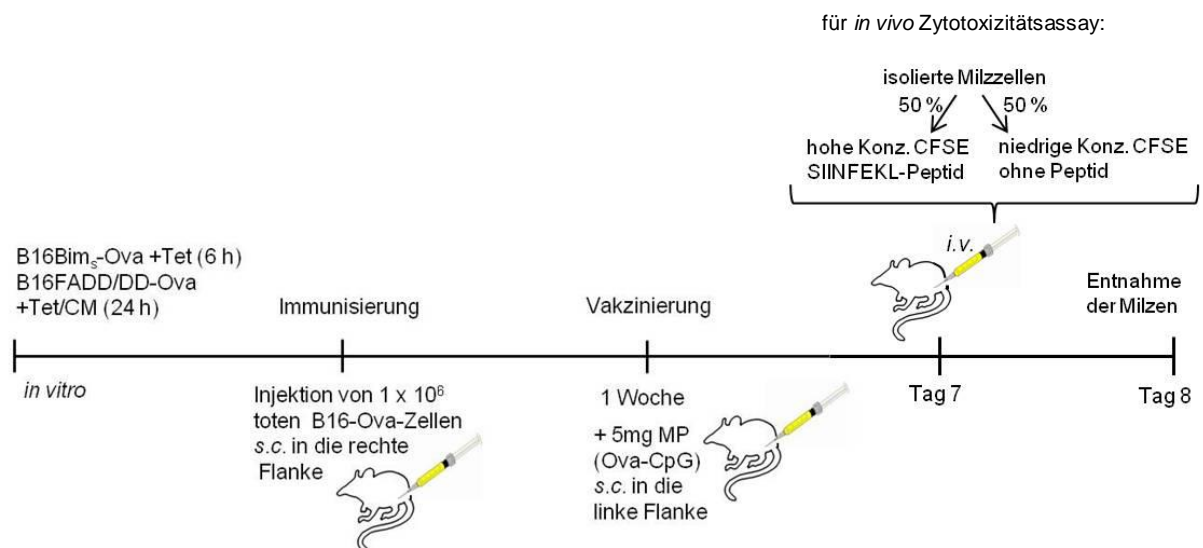


Abb.46: Skizze des Mausmodells, in dem mit toten B16Ova-Zellen immunisiert, mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert und anschließend ein Zytotoxizitätstest durchgeführt wurde.

Abbildung 47 zeigt die Prozentzahl der SIINFEKL-markierten Milzzellen. Naive Mäuse wurden auf 100 % SIINFEKL-markierte Milzzellen gesetzt. Mäuse, die mit apoptotischen (Bim_S+Dox) Zellen immunisiert wurden weisen noch etwa 55 % an SIINFEKL-markierten Milzzellen auf. Mäuse, die mit nekrotischen (FADD/DD+Dox) Zellen immunisiert wurden zeigen nur noch etwa 15 % SIINFEKL-markierte Milzzellen. Der Unterschied zwischen Mäusen, die mit nekrotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, zu naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0233$). Auch der Unterschied zwischen Mäusen, die mit apoptotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, zu naiven Mäusen, ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant ($p = 0.0288$).

Doch der Unterschied von Mäusen, die entweder mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden, zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären behandelt wurden, ist nicht signifikant.

Die Daten deuten darauf hin, dass in Mäusen, die mit FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden, ein höherer zytotoxischer Effekt nachzuweisen ist als bei Mäusen, die mit Bim_S- induzierten apoptotischen B16-Zellen immunisiert wurden.

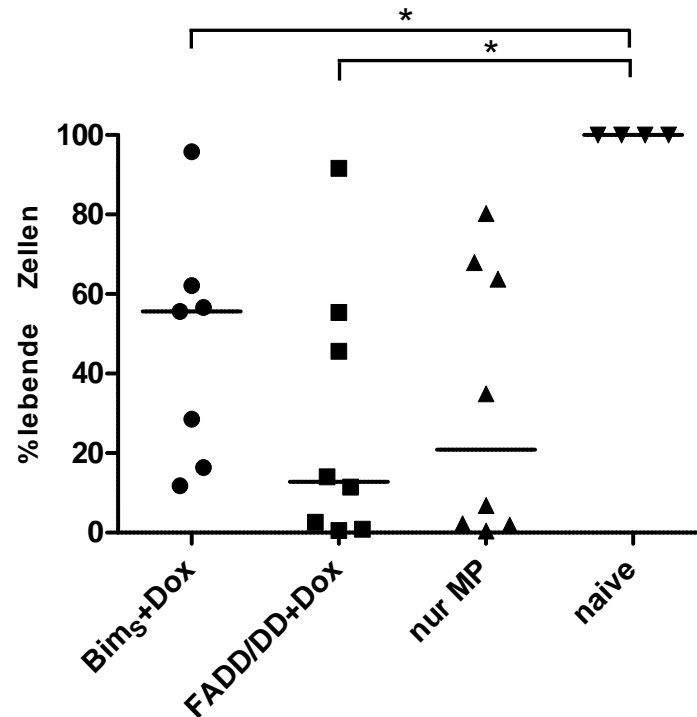


Abb.47: Prozentzahl der überlebten SIINFEKL-markierten Milzzellen nach Zytotoxizitätstest in Mäusen, die mit Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden. Abgebildet sind SIINFEKL-markierte Milzzellen, die mit einer hohen Konzentration an CFSE inkubiert wurden. Der Unterschied von Mäusen, die entweder mit apoptotischen B16Bim_S-Zellen ($p = 0.0288$) oder mit nekrotischen B16FADD/DD-Zellen ($p = 0.0233$) immunisiert wurden, zu naiven Mäusen ist nach dem Wilcoxon *Two-Sample* Test statistisch signifikant. (*, $p < 0,05$, Wilcoxon *Two-Sample* Test). 8 Mäuse, die nur mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden und 4 naive Mäuse dienten als Kontrolle.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden Modelle entwickelt, in denen zwei verschiedene Arten von Zelltod in der B16-Mausmelanomzelllinie ausgelöst werden konnten. Zum einen konnte durch die Expression des BH3-*only* Proteins Bim_S Apoptose und zum anderen durch die Expression des verkürzten Adapterproteins FADD/DD Nekrose in B16-Zellen induziert werden. Diese gut definierten Systeme bieten die Möglichkeit, den Einfluss der verschiedenen Zelltodarten auf das Immunsystem zu untersuchen.

4.1 Morphologische Veränderungen in apoptotischen Bim_S-induzierten und nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen

Beide Arten von Zelltod sind durch gut unterscheidbare morphologische Eigenschaften charakterisiert. Während der Apoptose wird aktiv eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu physiologischen und morphologischen Veränderungen der Zelle führt. Zunächst schrumpft die Zelle, Chromatin kondensiert und DNA wird degradiert. Durch biochemische Vorgänge werden Proteine des Zytoskeletts sowie Adhäsionsmoleküle verändert, sodass sich die Zelle aus dem Zellverband löst und abrundet (Häcker, 2000). Nekrotische Zellen hingegen schwellen an, die Membran wird durchlässig und die Membranintegrität wird aufgelöst. Die zellulären Kompartimente werden in den extrazellulären Raum entlassen und die Zelle lysiert (Denecker et al. 2001).

Im Modell des apoptotischen Zelltodes wurde die kurze Form des proapoptotischen BH3-*only* Proteins Bim (Bim_S) zur Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges ausgewählt. Die Tetracyclin-induzierte Expression von Bim_S in B16-Zellen stellt einen spezifischen Stimulus dar, durch den der programmierte Apoptosesignalweg ausgelöst werden kann.

Im nekrotischen Signalweg sind noch viele Details unklar. Die beste Möglichkeit, um gezielt Nekrose auszulösen, ist die Expression der verkürzten Form des Adapterproteins FADD (FADD/DD). Im Modell des nekrotischen Zelltodes wurde mit Hilfe der Tetracyclin-induzierten Expression von FADD/DD in B16-Zellen Nekrose induziert.

Diese Modelle haben den Vorteil, dass durch die gezielte Expression der Todesgene Signalkaskaden aktiviert werden, die ohne unspezifische Nebeneffekte entweder Apoptose oder Nekrose induzieren. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bim_S-induzierte Apoptose und die FADD/DD-induzierte Nekrose in B16-Zellen mit verschiedenen Methoden deutlich dargestellt und analysiert werden.

Bim_S- als auch FADD/DD-induzierte B16-Zellen wiesen morphologische Veränderungen auf. Bim_S- und FADD/DD-induzierte B16-Zellen verloren ihre Adhärenz und lösten sich vom

Untergrund ab. B16-Zellen, in denen Bim_S exprimiert wurde, rundeten sich ab und wiesen typische apoptotische Körperchen auf. Bim_S-induzierte B16-Zellen zeigten bereits nach 6 h in über der Hälfte der Zellen fragmentierte Zellkerne. Dies konnte durch Färbung der Zellkerne mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst 33258 nachgewiesen werden. Weitere durchflusszytometrische Analysen haben gezeigt, dass Bim_S-induzierte im Gegensatz zu FADD/DD-induzierten B16-Zellen in ihrer Größe abnahmen. B16-Zellen, in denen FADD/DD exprimiert wurde, rundeten sich ebenfalls ab, zeigten aber keine apoptotischen Körperchen. FADD/DD-induzierte B16-Zellen verloren erst nach 24 h ihre Membranintegrität. Die Daten zeigen, dass der Bim_S-induzierte Apoptosesignalweg deutlich schneller abläuft als der FADD/DD-induzierte Nekrosesignalweg.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass Bim_S-induzierte B16-Zellen in ihrer Größe abnahmen, die Zellkerne schrumpften (Karyopyknose) und Kernfragmentierungen (Karyorrhexis) auftraten. FADD/DD-induzierte B16-Zellen hingegen zeigten keine Größenveränderungen. Die Zellkernveränderungen beschränkten sich auf die Kondensierung des Chromatins. Eine Ultrastrukturanalyse von FADD/DD-induzierten B16-Zellen zeigte einen deutlichen Austritt des Zytosols aus der Zelle und eine Auflösung der Zellmembran. Zudem war der Zellkern teilweise kondensiert und der Golgi-Apparat wurde deutlich sichtbar. Diese morphologischen Veränderungen lassen eine deutliche Unterscheidung zwischen beiden Zelltodarten zu. Der Bim_S-induzierte Zelltod weist Charakteristika auf, die denen während der Apoptose entsprechen. FADD/DD-induzierte Zellen zeigen Eigenschaften, die während der Nekrose auftreten.

Ein weiteres biochemisches Merkmal für apoptotischen Zelltod ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite. Durch Färbung von toten Zellen mit dem Phospholipidbindenden Protein Annexin-V und dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumjodid kann man apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden. Eine Doppelfärbung von Bim_S-induzierten B16-Zellen Annexin-V und Propidiumjodid (PI) zeigte neben den Annexin-V/PI doppelt positiven Zellen eine Population auf, die positiv für Annexin-V, aber negativ für Propidiumjodid war. Das bestätigt, dass Bim_S in B16-Zellen Apoptose auslösen kann. Die gleiche Färbung von FADD/DD-induzierten B16-Zellen wies nur die Population auf, die positiv sowohl für Annexin-V als auch für Propidiumjodid war, nicht aber die Annexin-V-positive, PI-negative Population. Dies lässt auf einen nekrotischen Zelltod schließen. Somit kann auch durch dieses Merkmal der Bim_S- von dem FADD/DD-induzierten Zelltod deutlich unterschieden werden.

Propidiumjodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, mit dem man im Durchflusszytometer auch den DNA-Gehalt von Zellen messen kann. In apoptotischen Zellen ist die DNA degradiert und die Zellkerne fragmentiert. Durch Färbung von apoptotischen Zellen mit Propidiumjodid kann man Zellen mit einem DNA-Gehalt beobachten, der tiefer ist als bei einer normalen

Zelle. Diese Zellen werden als sub-G1-Population bezeichnet. Um diese typische Charakterisierung für apoptotische Zellkerne auch in Bim_S-induzierten B16-Zellen nachzuweisen, wurden Bim_S-induzierte apoptotische und FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen nicht permeabilisiert, sondern direkt mit Propidiumjodid behandelt. Zellen, die eine defekte Plasma- bzw. Kernmembran aufweisen, nehmen Propidiumjodid auf. Zellkerne, in denen DNA degradiert ist, können weniger Propidiumjodid binden. In Bim_S-induzierten B16-Zellen konnte etwa 50 % an Zellen nachgewiesen werden, die in der Propidiumjodid-Färbung als Sub-G1-Population in Erscheinung traten, weil sie weniger Propidiumjodid binden konnten und somit einen geringeren DNA-Gehalt aufwiesen. Diese Zellen befinden sich im apoptotischen Prozess. In FADD/DD-induzierten B16-Zellen hingegen konnten nur sehr wenige Zellen nachgewiesen werden, die in der Propidiumjodid-Färbung eine Sub-G1-Population zeigten. Dies deutet darauf hin, dass der größte Teil der FADD/DD-induzierten B16-Zellkerne keine DNA-Degradierung oder –Fragmentierung aufweisen.

Diese Ergebnisse unterstreichen die nuklearen Unterschiede zwischen Bim_S-induzierten apoptotischen und FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Zellen.

4.2 Biochemische Veränderungen in apoptotischen Bim_S-induzierten und nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen

Das proapoptotische BH3-*only* Protein Bim ist in seiner kürzesten Form (Bim_S) an der mitochondrialen Apoptose beteiligt, die in Abhängigkeit von Caspasen abläuft. Nekrotische Zellen sterben unabhängig von Caspasen (Yin et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Westernblot die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 in Bim_S-induzierten B16-Zellen klar nachgewiesen werden, in FADD/DD-induzierten B16-Zellen wurde wenn, nur eine sehr schwache Spaltung beobachtet. Auch das Caspase-3-abhängige Substrat PARP wurde nur in Bim_S-induzierten B16-Zellen deutlich gespalten. Dass dennoch eine leichte Spaltung der Caspasen und auch von PARP in FADD/DD-induzierten B16-Zellen im Westernblot nachzuweisen war, kann daran liegen, dass in einigen B16FADD/DD-Zellen Zellstress ausgelöst wurde, der in Apoptose endete und somit eine Aktivität der Caspasen und von PARP verursachte. Der Anteil an Zellen, die diese Aktivität zeigen war jedoch wesentlich geringer als der in Bim_S-induzierten B16-Zellen. Der größte Teil der FADD/DD-induzierten B16-Zellen starb unabhängig von Caspasen und von PARP. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Bim_S-induzierte Zelltod caspasenabhängig und somit der Apoptose zuzuweisen ist. Der FADD/DD-induzierte Zelltod hingegen zeigt keine Caspasenaktivität, wodurch man auf einen nekrotischen Zelltod schließen kann.

Der Signalweg während der Nekrose ist noch weitgehend ungeklärt. Es wurde jedoch die

Kinase RIP1 identifiziert, die intrazellulär an das Adapterprotein FADD des Todesrezeptors bindet und im Nekrose-Signalweg auftritt. RIP1 ist eine Adapterkinase, die in stressinduzierten Signalwegen wie NF- κ B und MAPKs und im nekrotischen Signalweg eine Rolle spielt. Die Kinaseaktivität von RIP1 scheint allerdings nur im nekrotischen Signalweg und in der ERK-Aktivierung von Bedeutung zu sein (Festjens et al., 2007). Nekrostatin-1 wurde als Inhibitor der Kinase-Aktivität von RIP1 von Degterev et al. (2008) identifiziert, wodurch die Notwendigkeit von RIP1 im nekrotischen Signalweg bestätigt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Inhibierung von RIP1 durch Einsatz von Nekrostatin-1 der FADD/DD-induzierte Zelltod in B16-Zellen signifikant reduziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Induktion des verkürzten Adapterproteins FADD/DD ein RIP1-abhängiger Signalweg zur Nekrose ausgelöst wird. Ein geringer Teil der FADD/DD-induzierten Zellen zeigte nach Inhibierung mit Nekrostatin-1 jedoch Zelltod an. Dies könnte daran liegen, dass die Inhibierung von RIP1 unvollständig war oder dass nicht in allen B16FADD/DD-Zellen die Expression von FADD/DD angeschaltet wurde und die Zellen durch Zellstress starben. Bim_S-induzierte B16-Zellen zeigten hingegen mit und ohne Behandlung mit Nekrostatin-1 den gleichen Anteil an toten Zellen. Es konnte keine signifikante Reduktion der Bim_S-induzierten apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit Nekrostatin-1 festgestellt werden. Somit zeigten die Daten, dass der nekrotische Zelltod, der durch die Expression von FADD/DD ausgelöst wurde, durch die Blockade von RIP1 verhindert werden konnte. Der Bim_S-induzierte apoptotische Zelltod blieb durch Nekrostatin-1 unbeeinflusst. Dies lässt eine deutliche Unterscheidung der FADD/DD-induzierten Nekrose von der Bim_S-induzierten Apoptose zu.

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine klare Unterscheidung der beiden Zelltodarten durch die Expression der Todesgene Bim_S bzw. FADD/DD nachweisbar war, wird im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss von Apoptose oder Nekrose in B16-Mausmelanomzellen auf die Immunantwort untersucht und diskutiert.

4.3 Einfluss von toten B16-Melanomzellen auf Immunzellen *in vitro*

Zunächst wurden Experimente *in vitro* gemacht, in denen getestet wurde, ob Bim_S-induzierte apoptotische oder FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen von dendritischen Zellen phagozytiert werden. Anschließend wurde untersucht, ob durch Aufnahme von totem Material eine Reifung von dendritischen Zellen zustande kommt, wodurch letztendlich T-Zellen aktiviert und zur Proliferation veranlasst werden können.

4.3.1 Einfluss von apoptotischen Bim_S-induzierten oder nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Zellen auf Immunzellen *in vitro*

B16-Tumoren sind nur schwach immunogen. Um die Immunreaktion zu verstärken und um mehr Werkzeuge zur Analyse der Immunantwort zur Verfügung zu haben, wurden die Zelllinien B16Bim_S und B16FADD/DD mit dem Modellantigen Ovalbumin transduziert, das als tumorzellassoziiertes Antigen dient. Somit wurde ein sensitiveres System zur Antigenpräsentation und T-Zell Stimulation geschaffen.

Antigene können von sogenannten antigenpräsentierenden Zellen, vor allem den dendritischen Zellen aufgenommen und anderen Immunzellen präsentiert werden. Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass dendritische Zellen tote Tumorzellen aufnehmen und das tumorzellassoziierte Antigen nicht nur über MHC Klasse II präsentieren, sondern auch über MHC Klasse I Moleküle kreuzpräsentieren können (Nouri-Shirazi 2000, Amigorena und Savill 2010).

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Beseitigung von apoptotischen Zellen durch Phagozyten starke antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte haben (Savill und Fadok, 2000). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise darauf, dass unter bestimmten Umständen die Phagozytose von apoptotischen Zellen eine Immunantwort und eine Inflammation auslösen (Albert et al., 1998). Kacani et al. (2005) konnten zeigen, dass unreife dendritische Zellen sehr effizient nekrotische Zellen aufnehmen im Gegensatz zu lebenden oder apoptotischen Zellen. Zudem konnten sie einen immunstimulatorischen Effekt von nekrotischen Zellen auf dendritische Zellen bestätigen, da diese durch Aufnahme von nekrotischen Zellen in einen reifen Zustand gelangen und IL-12 produzierten.

Um die Balance zwischen anti- und proinflammatorischen Effekten durch Phagozytose von toten Zellen näher zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von apoptotischen oder nekrotischen B16-Melanomzellen auf dendritische Zellen getestet.

Bim_S- und FADD/DD-induzierte B16-Zellen wurden mit dendritischen Zellen kultiviert. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigte, dass sowohl apoptotische Bim_S- als auch nekrotische FADD/DD-induzierte B16-Zellen von aus dem Knochenmark differenzierten reifen dendritischen Zellen und auch von einer DC-Zelllinie aufgenommen werden. Es zeigte sich kein Unterschied in der Phagozytoseeffizienz, ob dendritische Zellen mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Melanomzellen in Kontakt traten.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische B16-Melanomzellen von dendritischen Zellen phagozytiert werden, korreliert mit Untersuchungen von Goldszmid et al. (2003), in denen UV-behandelte apoptotische Zellen und gefrierschockbehandelte nekrotische Zellen von Knochenmarks-DCs aufgenommen wurden.

Casares et al. (2005) hingegen haben Apoptose durch verschiedene Substanzen ausgelöst und anschließend die Aufnahme durch Knochenmarks-DCs getestet. Dabei fanden sie heraus, dass nicht alle Apoptose auslösenden Substanzen in der Lage waren, Phagozytose zu forcieren. Man weiß jedoch nicht genau, welche Auswirkungen die Substanzen in der Zelle haben und welche Nebeneffekte in der Zelle stattfinden. Apoptotische Zellen können bestimmte „eat me“-Signale senden, die andere Zellen dazu veranlassen, die apoptotischen Körperchen aufzunehmen. Vielleicht wird die Ausschüttung dieser Signale durch unspezifische Reaktionen auf chemotherapeutisch wirksame Substanzen verhindert, was dazu führen könnte, dass die Aufnahme durch dendritische Zellen ausbleibt. Im Falle des Bim_S-induzierten bzw. FADD/DD-induzierten Zelltodes hingegen ist der Stimulus sehr gezielt und unspezifische Nebeneffekte in der Zelle sind unwahrscheinlich.

Durch Phagozytose von totem Material können dendritische Zellen zur Reifung gebracht und somit stimuliert werden, Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Dies kann durch die Hochregulierung von MHC- und costimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Reife dendritische Zellen exprimieren verstärkt die Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86 und CD83 (Janeway und Medzhitov, 2002). Allerdings haben Gallucci et al. (1999) und Sauter et al. (2000) herausgefunden, dass nur nekrotische Zellen eine Reifung von dendritischen Zellen veranlassen und nicht apoptotische. Goldszmid et al. (2003) und Kotera et al. (2001) konnten hingegen belegen, dass die Aufnahme von apoptotischen Zellen ebenfalls eine Reifung von dendritischen Zellen verursacht. Salino et al. (2000) postulieren, dass weder nekrotische noch apoptotische Zellen eine Reifung von dendritischen Zellen induzieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob phagozytierte apoptotische oder nekrotische B16-Melanomzellen eine Reifung von dendritischen Zellen verursachen können. Dazu wurden Experimente gemacht, in denen *in vitro* Bim_S- bzw. FADD/DD-induzierte B16-Zellen mit GM-CSF konditionierten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark zusammen kultiviert wurden. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker CD40 und CD86 gemessen, die auf der Oberfläche von reifen dendritischen Zellen erhöht ist. Sowohl Bim_S-induzierte apoptotische als auch FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen wurden durch dendritische Zellen aufgenommen. Doch eine Reifung der dendritischen Zellen und der damit verbundene Nachweis der Expression von CD40 und CD86 konnte durch die Aufnahme von Bim_S- oder FADD/DD-induzierten B16-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Wenn tote Zellen von dendritischen Zellen aufgenommen werden und diese in einen reifen Zustand gelangen, können sie die aufgenommenen Antigene für T-Zellen präsentieren. Bevor das Antigen jedoch auf MHC-Molekülen an der Oberfläche von dendritischen Zellen präsentiert werden kann, muss es in Peptidfragmente prozessiert werden. Damit eine vollständige Aktivierung von T-Zellen zustande kommt, werden drei verschiedene Arten von

Signalen benötigt. Dazu zählen antigene Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, costimulatorische Signale und Signale durch spezifische Zytokine.

Trotz der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine Reifung von dendritischen Zellen nach Aufnahme von Bim_S-induzierten apoptotischen oder FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Ova-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde getestet, ob dennoch nach Aufnahme von toten Zellen durch dendritische Zellen, T-Zellen zur Proliferation veranlasst werden können.

Dafür wurden Bim_S-induzierte apoptotische oder FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Ova-Zellen mit dendritischen Zellen und OT-1 T-Zellen kultiviert und die Proliferation von OT-1 T-Zellen gemessen. Das tumorzellassoziierte Antigen Ovalbumin konnte sowohl nach Aufnahme von apoptotischen als auch von nekrotischen B16-Ova-Zellen durch dendritische Zellen für OT-1 T-Zellen kreuzpräsentiert werden. OT-1 T-Zellen benötigen vergleichsweise wenig Costimulation, sodass vielleicht schon eine geringe Stimulierung der dendritischen Zellen ausreichte, um OT-1 T-Zellen zur Proliferation zu veranlassen.

Dass es nach Aufnahme von apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen durch dendritische Zellen *in vitro* gleichermaßen zur Aktivierung von T-Zellen kam, deutet darauf hin, dass beide Zelltodarten in der Lage sind, immunstimulierend zu wirken. Es ist bemerkenswert, dass kein Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose in der Immunreaktion *in vitro* festgestellt werden konnte.

Es stellt sich nun die Frage, ob durch Apoptose oder Nekrose proinflammatorische Signale wie zum Beispiel HMGB1 freigesetzt werden.

4.3.2 Proinflammatorische Signale wie HMGB1

Durch Zelltod können sogenannte DAMPs wie zum Beispiel HMGB1 freigesetzt werden und unterschiedliche immunologische Wirkungen hervorrufen. In der Literatur wird diskutiert, ob HMGB1 nur von nekrotisch sterbenden Zellen oder auch von apoptotischen Zellen ausgeschüttet wird. HMGB1 kann aktiv von inflammatorischen Zellen oder passiv als lösliche Moleküle aus nekrotischen Zellen ausgeschüttet werden (Krömer et al. 2008, Tang et al. 2010). Freigesetztes HMGB1 soll über den Toll-*like*-Rezeptor 4 an dendritische Zellen binden können und über die Präsentation von Tumorantigenen die Immunantwort kontrollieren können (Apetoh et al. 2007). Die Frage, ob HMGB1 auch während des apoptotischen Zelltodes ausgeschüttet wird, ist viel diskutiert. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass während des apoptotischen Zelltodes nukleare DNA freigesetzt und die Bindung von HMGB1 an die DNA erhöht wird. Sowohl Bell et al. (2006) als auch Tian et al. (2007) konnten zeigen, dass HMGB1 von apoptotischen Tumorzellen freigesetzt wird und

dass dies durch den pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk blockiert werden konnte.

Dies führt zu der Frage, ob auch Bim_S-induzierte apoptotische oder FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen HMGB1 freisetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Überstand sowohl von Bim_S-induzierten apoptotischen als auch von FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Zellen auf Vorhandensein von HMGB1 analysiert. Ein erstes Ergebnis im Westernblot zeigte, dass in beiden Fällen, nach Bim_S-induzierter Apoptose oder FADD/DD-induzierter Nekrose von B16-Melanomzellen, HMGB1 in den extrazellulären Raum freigesetzt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische Melanomzellen proinflammatorisch wirken können.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem Resultat aus vorherigen Versuchen der vorliegenden Arbeit. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische B16-Melanomzellen von dendritischen Zellen aufgenommen und tumorzellassoziiertes Antigen durch beide Zelltodarten für T-Zellen kreuzpräsentiert werden konnte. Sowohl apoptotische Bim_S-induzierte als auch nekrotische FADD/DD-induzierte B16-Zellen konnten T-Zellen zur Proliferation veranlassen.

Nun stellt sich die Frage, ob die *in vitro* dargestellte Situation auch im Mausmodell auftritt.

4.4 Einfluss von toten B16-Melanomzellen auf das Immunsystem *in vivo*

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde ein murines B16-Melanom-Modell angewandt, in dem in der Maus ein Tumor gesetzt und *in vivo* Tumorzelltod induziert wurde. Apoptose wurde über Bim_S und Nekrose über FADD/DD in B16-Tumorzellen *in vivo* durch Injektion von Doxycyclin ausgelöst. Doxycyclin kann ebenso wie Tetracyclin die Expression von Bim_S bzw. FADD/DD in B16-Zellen induzieren. Neben diesem Mausmodell wurde ein weiteres Mausmodell entwickelt, in dem *in vitro* Bim_S- bzw. FADD/DD in B16-Ova-Zellen induziert und anschließend zur Immunisierung eingesetzt wurden. Die Auswirkungen von Apoptose oder Nekrose auf das Tumorwachstum und der Einfluss dieser Zelltodarten auf das Immunsystem wurden untersucht.

Mäuse mit einem etablierten B16-Ova-Tumor, in dem entweder Apoptose durch Bim_S- oder Nekrose durch FADD/DD-Induktion ausgelöst wurde, zeigten keine messbare Immunantwort. Nach Tetramerkfärbung konnten keine SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut nachgewiesen werden. Auch eine intrazelluläre Zytokinfärbung für Interferon-γ (IFN-γ) von *in vitro* restimulierten Splenozyten zeigte keine IFN-γ-Produktion in CD8⁺ T-Zellen.

Zur Verstärkung der Immunantwort wurde ein Vakzinierungsmodell eingesetzt, in dem exogenes Antigen für antigenpräsentierende Zellen bereitgestellt und diese gleichzeitig durch ein Adjuvans aktiviert wurden. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen sind in der

Lage, Antigene für T-Effektorzellen zu kreuzpräsentieren und B-Zellen zu aktivieren. Heit et al. (2008) haben ein Vakzinierungsprotokoll entwickelt, in dem sie ein Adjuvans und ein Antigen in biologisch abbaubaren Mikrosphären verpackt haben. Dies haben wir uns zunutze gemacht und haben Mäuse, die einen B16Bim_S-Ova bzw. B16FADD/DD-Ova Tumor trugen oder mit toten B16-Zellen immunisiert wurden, mit Mikrosphären vakziniert, die das Antigen Ovalbumin gekoppelt mit dem adjuvanten TLR9-Liganden CpG-ODN 1826 enthielten. Heit et al. (2008) konnten zeigen, dass nach Vakzinierung mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären CpG eine TLR-abhängige Reifung von dendritischen Zellen verursachte und es zu einer Antigenpräsentation von Ova-Peptiden sowohl über MHC-Klasse-I als auch MHC-Klasse-II zustande kam. Durch die Vakzinierung mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären hat man die Möglichkeit, sowohl tolerisierende als auch verstärkte Effekte des Tumorzelltodes auf die T-Zell-Antwort zu messen.

Eine Reifung von dendritischen Zellen nach Vakzinierung mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären konnten wir ebenfalls nachweisen. *In vitro* Experimente, in denen BMDCs mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären inkubiert wurden, zeigten eine stärkere Expression der DC-Oberflächenmarker CD40, CD80 und CD86 als ohne Ova/CpG-haltige Mikrosphären (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt. Verweis auf Masterarbeit von A. Muschaweckh, Seite 61, Abb. 27).

4.4.1 Analyse des Tumorwachstums

Das Wachstum von etablierten B16-Melanomen konnte durch die Induktion von Bim_S bzw. FADD/DD durch Doxycyclin-Injektion nicht gestoppt werden. Die Tumoren zeigten ein kontinuierliches Wachstum. Auffällig war, dass die Tumoren, in denen Bim_S bzw. FADD/DD induziert wurde, tendenziell größer wurden als unbehandelte Tumoren.

Wenn aber zeitgleich zur Injektion von B16Bim_S-Zellen Bim_S durch Doxycyclin-Injektion induziert wurde, wuchs nur einer von vier Tumoren an. Daraus lässt sich schließen, dass zeitgleich zur Injektion der B16Bim_S-Zellen die durch Bim_S induzierte Apoptose in den Tumorzellen die Tumorbildung und das -wachstum unterdrückt hat. Aufgrund anfänglicher Schwierigkeiten wurde dieser Versuch nicht mit B16FADD/DD-Zellen durchgeführt.

Es stellt sich die Frage, warum sich das Volumen in etablierten Tumoren vergrößerte, wenn Zelltod im Tumorgewebe ausgelöst wurde. Da es technisch nicht möglich war, die Expression von Bim_S bzw. FADD/DD *in vivo* durch Injektion von Doxycyclin nachzuweisen, ist nicht klar, ob die Expression der Todesgene ausreichte, um das Wachstum eines etablierten Tumors zu stoppen.

Eine Auffälligkeit, die während der Entnahme von etablierten Tumoren auftrat, sollte

allerdings noch erwähnt werden. FADD/DD-induzierte nekrotische Tumoren waren häufig in ihrer Konsistenz flüssiger und ließen sich nur schwer aus dem umgebenden Gewebe entnehmen, ohne dass der Tumor zerfloss. Bim_S-induzierte apoptotische Tumoren hingegen, zeigten häufig eine eher feste gummiartige Konsistenz. Unbehandelte Tumoren wiesen eine feste Konsistenz auf.

4.4.2 Histologische Analyse von Tumorgewebe

Nach der Analyse des Tumorstadiums, wurden die Melanome histologisch untersucht. Allgemein konnte festgestellt werden, dass sowohl unbehandelte B16Bim_S- als auch unbehandelte B16FADD/DD-Tumoren histologisch wenig Unterschiede zeigten. In beiden Tumortypen traten große Flächen an intaktem B16-Tumorgewebe auf. In den unbehandelten Tumoren waren auch große Bereiche an toten Zellen zu finden, was für Tumorgewebe typisch ist. Die Tumoren waren von Blutgefäßen durchwachsen. Tumoren, in denen entweder durch Bim_S-Induktion Apoptose oder durch FADD/DD-Induktion Nekrose ausgelöst wurde, zeigten große tote Areale. In der Detailansicht konnte man sogar fragmentierte Zellkerne erkennen, die ein typisches Merkmal für apoptotische Zellen darstellen. Der Anteil an apoptotisch veränderten Zellkernen war im Durchschnitt in Bim_S-induzierten Tumoren wesentlich höher als in unbehandelten B16Bim_S-Tumoren. Dies deutet darauf hin, dass durch die Injektion von Doxycyclin die Bim_S-induzierte Apoptose höher war als in unbehandelten B16Bim_S-Tumoren. In FADD/DD-induzierten nekrotischen Tumoren konnte im Gegensatz zu unbehandelten B16FADD/DD-Tumoren kein Anstieg an fragmentierten Zellkernen festgestellt werden.

4.4.3 Immunologische Analyse von Mäusen mit etabliertem B16-Tumor, in dem Apoptose *in vivo* induziert wurde

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antitumorimmunantwort in Mäusen mit etabliertem B16Ova-Tumor getestet. Dafür wurden B16Ova-Bim_S-Zellen in die Flanken von Mäusen injiziert und bei einem Tumordurchmesser von ca. 5 mm² Zelltod durch Doxycyclin-Applikation (*i.p.*) in den Tumoren induziert. Nach sieben Tagen wurde die Immunantwort durch Vakzinierung mit Ova-CpG-haltigen Mikrosphären verstärkt und die Mäuse wurden acht Tage später auf SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Blut und in der Milz getestet. Außerdem wurde die Aktivität der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe einer intrazellulären Interferon- γ -Färbung nachgewiesen.

Die Daten der T-Zell-Analyse im Blut und in der Milz aus Mäusen mit etabliertem B16Bim_S-

Tumore sind widersprüchlich. Die Blutanalyse zeigte eine leichte Erhöhung von SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Mäusen, in deren Tumoren Apoptose nach Bim_S-Induktion ausgelöst wurde im Gegensatz zu Mäusen, die einen unbehandelten B16Ova-Bim_S-Tumor besaßen oder solchen, die nur mit Mikrosphären behandelt wurden. Die Analyse der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz ergab eine leichte Reduktion in Mäusen, in deren Tumoren Apoptose durch Bim_S-Induktion ausgelöst wurde im Gegensatz zu Mäusen mit unbehandelten Tumoren oder Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Zu diesen Daten ist zu sagen, dass innerhalb der Gruppen sehr große Schwankungen auftraten und dass insgesamt eine größere Stichzahl analysiert werden muss, um eine statistische Signifikanz zu erzielen. Lediglich zwei Mäuse, in deren Tumoren Bim_S induziert wurde, zeigten sowohl in der Blut- als auch in der Milzanalyse eine erhöhte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen.

Dennoch ist auffällig, dass Mäuse ohne etablierten Tumor, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden, einen starken Anstieg in der T-Zell-Antwort zeigten. Auch die Aktivität der CD8⁺ T-Zellen, die durch intrazelluläre Messung von Interferon-γ nachweisbar ist, zeigte einen starken Anstieg der IFN-γ⁺ T-Zellen in der Milz von Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden.

In diesem Modell stellt sich die Frage, inwiefern *i.p.* verabreichtes Doxycyclin nach Etablierung des Tumors die Tumorzellen noch erreicht. Daher wurde in dem Modell der vorliegenden Arbeit die Doxycyclin-Applikation am folgenden Tag wiederholt, um die Dox-Konzentration in den Mäusen aufrecht zu halten. Dennoch ist es schwer nachzuvollziehen, in wie vielen Zellen Bim_S induziert wurde und ob es innerhalb des Tumors einen Wachstumsvorteil für nicht induzierbare B16Bim_S-Zellen gibt.

Das Modell der Zelltodinduktion in etablierten B16-Tumoren durch Injektion von Doxycyclin muss noch näher untersucht werden. Zu viele Details sind unklar und können im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

4.4.4 Immunologische Analyse von Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden

Um die Frage zu klären, wie das Immunsystem auf eine Immunisierung mit apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen reagiert, wurde ein weiteres Mausmodell etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die immunologische Reaktion von Mäusen analysiert, die entweder mit Bim_S-induzierten apoptotischen oder FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Ova-Zellen immunisiert wurden. In diesem Mausmodell wurde *in vitro* Bim_S bzw. FADD/DD induziert und anschließend in die Flanken von Mäusen injiziert. Eine Woche später wurden

die Mäuse mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert. Nach sieben weiteren Tagen wurden das Blut und die Milz der Mäuse auf Ova-spezifische CD8⁺ T-Zellen und auf intrazelluläre Interferon- γ -Produktion in Splenozyten untersucht. Abschließend wurde ein Experiment durchgeführt, in dem ein Zytotoxizitätstest zur Analyse der zytotoxischen T-Zell-Antwort auf apoptotische bzw. nekrotische B16-Tumorzellen gemacht wurde.

Experimente der vorliegenden Arbeit *in vivo* deuten darauf hin, dass mit Ovalbumin und CpG vakzinierte Mäuse, die mit Bim_S-induzierten apoptotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, prozentual weniger CD8⁺ T-Zellen im Blut aufwiesen als Mäuse, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Dies deutet darauf hin, dass Bim_S-induzierte apoptotische B16-Zellen, mit denen Mäuse immunisiert wurden, einen eher supprimierenden oder tolerisierenden immunologischen Effekt aufweisen. Da hingegen zeigten mit Ovalbumin und CpG vakzinierte Mäuse, die mit FADD/DD-induzierten nekrotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, eine höhere Prozentzahl an CD8⁺ T-Zellen im Gegensatz zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Diese Daten deuten darauf hin, dass FADD/DD-induzierte nekrotische B16-Zellen, mit denen Mäuse immunisiert wurden, eher immunstimulierend wirken.

In beiden Fällen kann jedoch nur eine Tendenz festgestellt werden, denn die Unterschiede der mit toten Tumorzellen immunisierten Mäuse zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden, sind nicht signifikant. Allerdings zeigten Mäuse, die mit nekrotischen B16FADD/DD-Ova-Zellen immunisiert wurden, eine signifikant höhere Prozentzahl an CD8⁺ T-Zellen als der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen. Auch der Unterschied zwischen apoptotisch und nekrotisch immunisierten Mäusen war signifikant.

Die Schwierigkeit, aus den vorliegenden Daten eine Aussage zu treffen, liegt zum einen darin, dass zu wenige Mäuse getestet wurden und die Schwankungen innerhalb der Gruppen sehr groß waren. Dennoch deuten die Daten darauf hin, dass nekrotische im Gegensatz zu apoptotischen B16-Tumorzellen eine T-Zell-Antwort *in vivo* induzieren. Diese Aussage widerspricht den Daten aus den Experimenten *in vitro*. *In vitro* konnten sowohl durch apoptotische als auch durch nekrotische Tumorzellen T-Zellen nach Kreuzpräsentation des tumorzellassozierten Antigens durch dendritische Zellen aktiviert werden. Natürlich ist *in vitro* eine Situation gegeben, in der tote B16-Zellen sehr dicht mit dendritischen Zellen in Berührung kommen und die Faktoren minimiert sind.

Dennoch konnte die Tendenz, dass in mit nekrotischen B16-Zellen immunisierten Mäusen eine Immunantwort verstärkt werden konnte, *in vivo* auch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Um die Effektivität von CD8⁺ T-Zellen zu testen, wurde eine intrazelluläre Interferon- γ -Färbung von CD8⁺ T-Zellen gemacht. Dafür wurden CD8⁺ T-Zellen aus dem Blut von Mäusen isoliert, die mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert und entweder mit

apoptotischen Bim_S-induzierten oder nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden. Aus den isolierten Milzen der Versuchsmäuse wurden die CD8⁺ T-Zellen mit dem SIINFEKL-Peptid restimuliert und nach 6 h auf intrazelluläres Interferon-γ angefärbt. Die Daten zeigten, dass bei Mäusen, die mit nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden, ein Anstieg der Interferon-γ-produzierenden CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Somit konnten nicht nur prozentual mehr Ova-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Blut von Mäusen, die mit nekrotischen FADD/DD-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden, sondern auch eine erhöhte Effektivität der CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit apoptotischen Bim_S-induzierten B16-Ova-Zellen immunisiert wurden, tendenziell weniger Interferon-γ-produzierende CD8⁺ T-Zellen. Dieses Ergebnis korreliert mit der prozentual geringeren Anzahl an Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus der Blutanalyse. Der Unterschied sowohl von mit Ovalbumin vakzinierten apoptotischen als auch nekrotischen Tumorzellen zu naiven Mäusen zeigte Signifikanz. Doch der Unterschied dieser toten Tumorzellen zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden, war nicht signifikant. Somit lässt sich auch hier nur eine Tendenz feststellen.

Die Daten deuten darauf hin, dass eine Immunisierung mit FADD/DD-induzierten nekrotischen B16-Zellen in Mäusen eine Immunantwort induziert. Im Gegensatz dazu zeigen die Daten, dass eine Immunisierung mit Bim_S-induzierten apoptotischen B16-Zellen in Mäusen eine eher immunsuppressive oder tolerisierende Wirkung hat.

4.4.5 Analyse der zytotoxischen T-Zell Antwort in Mäusen, die mit apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen immunisiert wurden

Zytotoxische T-Zellen können Apoptose in Zielzellen auslösen, die Fremdpeptide enthalten, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden an die Zelloberfläche transportiert werden. Die zytotoxische T-Zelle setzt Substanzen wie Perforin oder Granzyme aus ihren Granula frei, welche Apoptose in der Zielzelle auslösen. Zytokine wie Lymphotoxine oder die Beteiligung von CD95 auf der Zielzelle können ebenfalls den Tod der Zielzelle induzieren (Male, 2005). Inkubiert man zytotoxische T-Zellen mit einem Gemisch aus zwei Arten von Zielzellen in gleichen Anteilen, von denen nur die eine ein spezifisches Antigen trägt, so werden die antigenmarkierten Zellen abgetötet. Dieses Phänomen wurde genutzt, um zu testen, ob in Mäusen, die mit apoptotischen bzw. nekrotischen B16-Tumorzellen immunisiert wurden, ein zytotoxischer T-Zell-Effekt nachzuweisen ist.

Die Daten deuten darauf hin, dass bei Mäusen, die mit nekrotischen FADD/DD-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert wurden, ein stärkerer zytotoxischer Effekt auftrat als bei Mäusen,

die mit apoptotischen Bim_S-induzierten B16Ova-Zellen immunisiert wurden. Der Unterschied zwischen Mäusen, die entweder mit apoptotischen oder mit nekrotischen Tumorzellen immunisiert wurden, zu naiven Mäusen, ist signifikant. Doch der Unterschied zwischen Mäusen, die mit toten Tumorzellen immunisiert wurden zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden, ist nicht signifikant. Somit lässt sich auch hier wieder nur eine Tendenz feststellen, die allerdings mit den vorherigen Versuchen übereinstimmt.

Die Tendenz, dass FADD/DD-induzierte nekrotische B16Ova-Zellen auch eine stärkere zytotoxische T-Zell-Antwort auslösen, korreliert mit der erhöhten Anzahl an Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut und in der Milz und auch mit der leicht erhöhten Effektivität der CD8⁺ T-Zellen, was durch die intrazelluläre Färbung von Interferon- γ nachgewiesen werden konnte. Somit deuten die Daten an, dass nekrotischer Tumorzelltod eher stimulierend auf das Immunsystem wirkt.

Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit Bim_S-induzierten apoptotischen B16Ova-Zellen immunisiert wurden, nur einen leichten zytotoxischen Effekt im Vergleich zu Mäusen mit nekrotischer Immunisierung oder auch im Vergleich zu Mäusen, die nur mit Ova/CpG-haltigen Mikrosphären vakziniert wurden. Auch die geringere Anzahl an Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut und in der Milz unterstreichen die Annahme, dass Apoptose in Tumoren tendenziell einen eher supprimierenden oder tolerisierenden immunologischen Effekt hervorzurufen scheint.

Diese ersten Experimente *in vivo* unterstreichen die weit verbreitete Annahme, dass Nekrose im Gegensatz zur Apoptose eine eher immunstimulierende Reaktion zu verursachen scheint.

4.4.6 Mögliche weiterführende Experimente

Für weiterführende Experimente könnte man die Beteiligung von CD4 T-Zellen an der Antitumor-Immunantwort testen (Torchinsky et al. 2009).

Außerdem bietet das B16-Melanommodell die Möglichkeit, eine systemische Auswirkung von Tumorzellen zu testen. Dabei werden B16-Zellen i.v. injiziert und können in der Lunge Metastasen bilden. Vielleicht wäre in diesem Modell die Induktion von Zelltod über Doxycyclin-Applikation effektiver.

Weiterhin könnte man die Migration von B16-Melanomzellen *in vitro* testen und das Verhalten der Zellen nach Zelltodinduktion verfolgen. Daran könnte man sehen, ob eine Migration von B16-Tumorzellen durch Bim_S-induzierter Apoptose oder FADD/DD-induzierter Nekrose verhindert werden kann.

Um mehr Informationen zur Kreuzpräsentation von Tumorantigenen auf DCs für T-Zellen zu bekommen, könnte man die Subtypen der dendritischen Zellen (CD8 α), die eine hohe Affinität zur Kreuzpräsentation besitzen, isolieren und zusammen mit T-Zellen und apoptotischen oder nekrotischen B16-Zellen kultivieren. Anschließend könnte die Proliferation von T-Zellen testen.

Außerdem wäre es spannend zu testen, ob das Inflammasom in der Zelltodinduzierten Immunantwort eine Rolle spielt.

Abkürzungsverzeichnis

APAF-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APC	Antigen präsentierende Zellen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BCR	B Zell-Rezeptor
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	BH3-interacting-domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2-modifying factor
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BMDC	reife dendritische Zellen aus dem Knochenmark
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFSE	Carboxy-fluoresceindiacetat succinimidyl ester
CM	Coumermycin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	Cytotoxische T Lymphocyten
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>death effector domain</i>)
DISC	Death inducing complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EMA	Ethidiummonoazid-bromid
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain-containing protein
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	Vorwärtslichtstreuung (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMGB1	high mobility group box 1
HSP	Hitzeschockprotein
HPF	high power field
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor von NF-κB
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KOH	Kaliumhydroxid
Kb	Kilobasenpaar
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar, (Mol/l)
MACS	magnetic-activated cell sorting
Mcl-1	myeloid-cell leukaemia sequence 1
MEFs	mouse embryonal fibroblasts
MeOH	Methanol
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mol	1 Mol enthält 6,022 x 10 ²³ Moleküle

MP	Mikrosphären
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NK	Natürliche Killerzellen
Ova	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Maß für den Säuregrad
PI	Propidium-Iodid
PRR	pattern recognition rezeptor
PS	Phosphatidylserin
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RIP1	Rezeptorinteraktionsprotein 1
RNA	Ribonuceinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Median (standard error of the mean)
SSC	Seitwärtslichtsterung (<i>side scatter</i>)
Sts	Staurosporin
tBid	Verkürztes Bid (<i>truncated Bid</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N'N'N'N'-Tetraethylmethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TGF-β	transforming growth factor-b
Th	Helfer T-Zelle
TLR	Toll- <i>like</i> Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNF-R	TNF-Rezeptor

TRAIL

Tris	Tris (hydroxy-methyl)-aminomethan
TNF	TNF-related apoptosis inducing ligand
U,u	Einheiten (<i>units</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/sec}^2$)

Literaturverzeichnis

Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86–89.

Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb; 22(1):109-17. Epub 2010 Feb 18. Review.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995 Oct; 15(4):961-73.

Apetoh L, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J. P. Mira, S. Delaloge, F. André, T. Tursz, G. Kroemer, L. Zitvogel. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev*. 220:47-59.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28; 281(5381):1305-8. Review.

Barker RN, Erwig LP, Hill KS, Devine A, Pearce WP, Rees AJ. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clin Exp Immunol*. 2002 Feb; 127(2):220-5.

Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Dec; 291(6):C1318-25.

Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol*. 1998 Jul 15; 161(2):897-908.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970; 13:1-27. Review.

Bustin M. 2010. High mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1799(1-2):1-2

Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science*. 1984 Jun 22; 224(4655):1312-6.

Casares, N., M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, et al. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med*. 202: 1691–1701.

Chan, C. W., F Housseau. 2008. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 58–69

Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol*. 1999 Sep 9; 9(17):967-70.

Chen Q, Stone PR, McCowan LM, Chamley LW. Phagocytosis of necrotic but not apoptotic trophoblasts induces endothelial cell activation. *Hypertension*. 2006 Jan; 47(1):116-21.

Cory S., J. M. Adams. 2002. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.

Nat. Rev. Cancer 2: 647-656.

Degterev, A., J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, et al. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4: 313–321.

Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz, and J. Yuan. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1: 112–119.

Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G, Zhivotovsky B, Fiers W, Grooten J, Declercq W, Vandenabeele P. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001 Aug;8(8):829-40.

Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009 Nov; 11(13):1050-62. Epub 2009 Sep 4.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**(4), 495-516 (2007)

Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890–898.

Farrar, M. A., I. Alberol, and R. M. Perlmutter. 1996. Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383: 178–181.

Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele. 2006. Necrosis, a wellorchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1371–1387.

Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, and P. Vandenabeele. 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ.* 14: 400–410.

Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975 Jan; 35(1):218-24.

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999 Nov; 5(11):1249-55.

Galluzzi L., O. Kepp, G. Kroemer. RIP Kinases Initiate Programmed Necrosis. *Journal of Molecular Cell Biology.* 2009, 1, 8–10

Gamrekelashvili, J., C. Kruger, R. von Wasielewski, M. Hoffmann, K. M. Huster, D. H. Busch, M. P. Manns, F. Korangy, and T. F. Greten. 2007. Necrotic tumor cell death in vivo impairs tumor-specific immune responses. *J. Immunol.* 178: 1573–1580.

Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 15; 179(10):903-13.

Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, Müller A, Homey B. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem.* 2009 Dec; 390(12):1213-23. Review.

- Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, A. I. Bravo, R. Steinman, J. Mordoh, R. Wainstok. 2003. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J. Immunology*. **171**(11), 5940-7
- Häcker, G. The morphology of apoptosis. 2000. *Cell Tissue Res*. **301**(1), 5-17
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008 Aug; 9(8):857-65.
- Heit, A., F. Schmitz, T. Haas, D. H. Busch, H. Wagner. 2007. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol*. **37**(8), 2063-74
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol*. 1: 489–495.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport, M. Schlomchik. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Garland Press, New York, ed. 6, 2005)
- Janeway, C., R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*. **20**, 197-216
- Janssen, E., K. Tabeta, M. J. Barnes, S. Rutschmann, S. McBride, K. S. Bahjat, S. P. Schoenberger, A. N. Theofilopoulos, B. Beutler, and K. Hoebe. 2006. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity* 24: 787–799.
- Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS. The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. *J Immunol*. 2007 May 15; 178(10):6495-503.
- Joule, R. J., A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Molecular Cell Biology*. Vol. 9. Jan 2008.
- Kacani L, Wurm M, Schwentner I, Andrlé J, Schennach H, Sprinzl GM. Maturation of dendritic cells in the presence of living, apoptotic and necrotic tumour cells derived from squamous cell carcinoma of head and neck. *Oral Oncol*. 2005 Jan; 41(1):17-24.
- Kawahara, A., Y. Ohsawa, H. Matsumura, Y. Uchiyama, and S. Nagata. 1998. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J. Cell Biol*. 143: 1353–1360.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**(4), 239-57
- Kodama T, Takeda K, Shimozato O, Hayakawa Y, Atsuta M, Kobayashi K, Ito M, Yagita H, Okumura K. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur J Immunol*. 1999 Apr; 29(4):1390-6.
- Kotera Y, Shimizu K, Mulé JJ. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8105-9.
- Kroemer G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green. 2008. Classification of cell death:

recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 12: 1463–1467.

Krysko D. V., K. D'Herde, P. Vandenabeele. 2006. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*. 11(10), 1709-26

Kumar S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14, 32–43

Kuwana T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green, D. D. Newmeyer. 2005. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*, Vol. 17, 525–535

Lawrence CP, Chow SC. FADD deficiency sensitises Jurkat T cells to TNF-alpha-dependent necrosis during activation-induced cell death. *FEBS Lett.* 2005 Nov 21; 579(28):6465-72. Epub 2005 Nov 2.

Letai A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, S. J. Korsmeyer. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*: Sept 2002. Vol. 2

Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2(10):754-61.

Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1(2), 135-45

Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med.* 2000 Nov; 36(5):483-506.

Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, Palucka KA. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol.* 2000 Oct 1; 165(7):3797-803

O'Connor, L., A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory, D. C. Huang. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17(2), 384-95

Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007 Oct; 14(10):1848-50.

Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature.* 2001 Jun 28; 411(6841):1058-64.

Overwijk, W. W., N. P. Restifo. 2001. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* 20.1.1-20.1.29

Prévost-Blondel A, Zimmermann C, Stemmer C, Kulmburg P, Rosenthal FM, Pircher H. Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol.* 1998 Sep 1; 161(5):2187-94.

Reiter, I., B. Krammer, G. Schwamberger. Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J. Immunol.* 163(4), 1730-2

Roach HI, Clarke NM. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res.* 1999 Aug; 14(8):1367-78.

Salino, M., V. Cerundolo, and A. Lanzavecchia. 2000. Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 705–708.

Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj. 2000. Consequences of cell death. Exposure to necrotic cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **191**(3), 423-34

Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 965–975.

Savill, J., V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* Vol. 407.

Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007 Oct; 219:143-56. Review.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002 Jul 11; 418(6894):191-5.

Sims G. P., D. C. Rowe, S. T. Rietdijk, R. Herbst, A. J. Coyle. HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2010. 28:367–88

Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **5**(3), 189-200 (2005)

Strasser, A., L. O'Connor, V. M. Dixit. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217-45 (2000)

Tang D., Rui Kang, Herbert J. Zeh III, Michael T. Lotze. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1799 (2010) 131–140

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today.* 1992 May;13(5):151-3. Review.

Tesniere A., T. Panaretakis, O. Kepp, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, L. Zitvogel, G. Kroemer. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell Death. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 3–12

Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science.* 2001 Feb 23; 291(5508):1544-7.

Thornberry, N. A., Y. Lazebnik. Caspases: enemies within. *Science.* **281**(5381), 1312-6 (1998)

Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent

- activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007 May;8(5):487-96.
- Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2009 Mar 5;458(7234):78-82.
- Vanden Berghe, T., G. van Loo, X. Saelens, M. Van Gurp, G. Brouckaert, M. Kalai, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 2004. Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. *J. Biol. Chem.* 279: 7925–7933.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, and T. V. Berghe. 2008. Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. *Trends Biochem. Sci.* 33: 352–355.
- Vanlangenakker, N., T. V. Berghe, D. V. Krysko, N. Festjens, and P. Vandenabeele. 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8: 207–220.
- Weber, A., S. A. Paschen, K. Heger, F. Wilfling, T. Frankenberg, H. Bauerschmitt, B. M. Seiffert, S. Kirschnek, H. Wagner, and G. Hacker. 2007. Bim_S-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Cell Biol.* 177: 625–636.
- Willmsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature.* 2005 Sep 1;437(7055):141-6.
- Yin X. M. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res.* 2000 Sep; 10(3):161-7.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Georg Häcker**, der mir dieses interessante und spannende Thema zur Anfertigung meiner Doktorarbeit bereit gestellt hat. Seine fachliche Beratung und sein tiefes Interesse an meiner Arbeit haben mich stets motiviert und begeistert.

Herrn **PD Dr. Robert Besch** danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit und seine interessanten Diskussionen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau **Dr. Susanne Kirschnek** für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und professionelle Betreuung. Sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite, hatte immer ein offenes Ohr für Diskussionen und war stets interessiert und motiviert in diesem Projekt.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die interessanten Diskussionen und die netten Aktivitäten bedanke ich mich bei **meinen Kolleginnen und Kollegen**. Für die stete Hilfsbereitschaft im Labor danke ich ganz besonders meiner Kollegin **Juliane Vier**.

Für die gewissenhafte und fleißige Weiterführung meiner Arbeit während meiner Elternzeit danke ich **Andreas Muschaweckh**, der im Rahmen dieses Projektes seine Masterarbeit anfertigte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, die mich während dieser Zeit immer gut beraten, motiviert und liebevoll begleitet haben. Meinem Ehemann **Nikolai Lohmann** danke ich besonders für seine außerordentliche Geduld und für seine grenzenlose Rückenstärkung und meinem Sohn **Felix Lohmann** für die abwechslungsreiche Zeit. Meinem Vater **Dr. Klaus-Dieter Wolkewitz** danke ich sehr für sein großes Interesse an meiner Arbeit und die fachlichen und motivierenden Gespräche. Meiner Mutter **Anne Wolkewitz** danke ich besonders für ihre Spontanität und die seelische Unterstützung. Meinem Bruder **Dr. Martin Wolkewitz** danke ich für die professionelle Beratung in statistischen Fragen und meinem Bruder **Dirk Wolkewitz** für die motivierenden Gespräche.